

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

**PREPARO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO  
CITOTÓXICA DE MICRO E NANOPARTÍCULAS DE *Spirulina* sp. LEB-18**

LIDIANE MOREIRA CHIATTONI

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de doutora em Engenharia e  
Ciência de Alimentos.

Profa. Dra. Leonor Almeida de Souza Soares

Orientadora

Profa. Dra. Michele Greque de Moraes

Coorientadora

Profa. Dra. Rosane da Silva Rodrigues

Coorientadora

Rio Grande, RS

2014



C532p Chiattoni, Lidiane Moreira.  
Preparo, caracterização física, nutricional e avaliação citotóxica de micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 / Lidiane Moreira Chiattoni. – 2014. 92 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2014.  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Leonor Almeida de Souza Soares.  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Michele Greque de Moraes.  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Rosane da Silva Rodrigues.

1. Spirulina 2. Biodisponibilidade 3. Cianobactéria 4. Ferro 5. Minerais  
6. Macronutrientes 7. Viabilidade celular I. Soares, Leonor Almeida de Souza  
II. Moraes, Michele Greque de III. Rodrigues, Rosane da Silva IV. Título.

CDU 664

**À minha mãe Izolete Silveira Muniz.**

## AGRADECIMENTOS

A tese aqui apresentada é a finalização de um trabalho que só foi possível devido à dedicação e sacrifício de inúmeras pessoas que, de uma forma ou outra, tiveram um papel muito importante. Como tal, gostaria de agradecer:

Inicialmente a Deus pela vida, pelas oportunidades e pelas pessoas que estão ao meu lado... A dois dos exemplos de vida que tenho: minha mãezinha **Izolete** e minha orientadora **Leonor**, duas amigas. A primeira está junto comigo há 31 anos e a segunda há quase 6. Independente do tempo eu posso dizer com toda convicção que minha chegada até aqui tem o dedo, a mão e o coração delas. Em outras palavras...as admiro tanto que o meu objetivo de vida é ser igual a elas...ser força, fé, amor, afago, paz...! A vocês duas, minhas amigas, o meu muito obrigado por estarem comigo sempre!!!

À amiga e coorientadora **Rosane** pela amizade, apoio e conhecimento a qualquer momento. Obrigada pelos sábados gostosos durante o trabalho de especialização, por me ouvir e pelos conselhos tão sábios.

À coorientadora **Michele** pela disponibilidade de sempre. Nos corredores na EQA nunca faltou apoio e eu sempre escutei dela “Lidi, se precisar de alguma coisa me procura, tá?”.

À amiga e colega **Anelise** sempre presente e disposta a ajudar na execução desta tese e de outros trabalhos da equipe. Com ela consegui dividir o sufoco; diminuir o estresse e aumentar a qualidade dos meus trabalhos. “Valeu”.

Às amigas e colegas **Carola, Denise, Jesus, Kelly, Lu, Rê e Vanessa Esquerdo** pela amizade, cia e ajuda sempre presentes.

Aos professores **Carlos Prentice-Hernandez, Eliana Badiale Furlong, Janaína Burkert e Jorge Alberto Vieira Costa** pelos trabalhos em equipe e apoio.

À **Islanda** pela ajuda sempre que solicitada. E também pelas risadas!!!

À professora **Ana Paula de Souza Votto** da Universidade Federal do Rio Grande pelo apoio técnico, à sua orientada **Priscila Antikeira** pela execução da análise citotóxica e toda **equipe do Laboratório de Cultura Celular.**

Ao professor **Cesar Avellaneda** e seu orientado **Ricardo Marcheseng** da Universidade Federal de Pelotas pelo apoio durante a análise de microscopia eletrônica.

Ao professor **Fábio Andrei Duarte** e ao **Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais** da Universidade Federal de Santa Maria, por todo apoio oferecido às análises realizadas.

À professora **Nádyá Pesche da Silveira** e suas orientadas **Andresa da Costa Ribeiro e Rafaella Marques Rodrigues** da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela ajuda durante a realização da técnica de espalhamento de luz.

Aos **Laboratórios de Micotoxinas e de Ciências de Alimentos, Engenharia Bioquímica e de Tecnologia de Alimentos** pela infraestrutura e a seus **laboratoristas** (Jesus, Roque e Sabrine) pelo suporte durante a execução desta proposta.

A **todos os professores e colegas** do curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior** (Rede Nanobiotec Brasil 04/2008), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (processo nº 472562/2012-6) e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul** (Protocolo nº 2485.271.13638.27022013) pela aprovação de projetos e apoio financeiro.

Aproveito também para agradecer ao professor **Guilherme Burgos**. Esse foi um grande amigo na época de curso pré-vestibular e de grandes dificuldades econômicas na minha família; disponibilizou-me uma bolsa de estudos no curso Vip-Pelotas que contribuiu com a minha aprovação no vestibular da Universidade Federal de Pelotas, a não ter mais vontade de parar e assim chegar até vocês com esta pesquisa. Obrigada a todos!!!

*Aqueles que têm um grande autocontrole, ou que estão totalmente absortos no trabalho, falam pouco. Palavra e ação juntas não andam bem. Repare na natureza: trabalha continuamente, mas em silêncio.” (Mahatma Gandhi)*

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>17</b>
<b>Artigo I</b> .....	<b>19</b>
Tabela 1. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.....	22
Tabela 2. Condições de operação do equipamento de espectrometria de emissão óptica com <b>plasma</b> indutivamente acoplado .....	23
Tabela 3. Conteúdo de minerais em <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 ( $\mu\text{g g}^{-1}\pm\text{DP}$ ) em comparação com valores preconizados pela <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) em <i>Spirulina</i> sp. Para consumo humano ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e recomendação de consumo diário (RDI) de minerais para crianças e adultos ( $\mu\text{g}$ ). .....	25
<b>Artigo II</b> .....	<b>32</b>
Tabela 1. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.....	37
Tabela 2 – Conteúdo de macronutrientes (%), minerais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e biodisponibilidade <i>in vitro</i> de ferro (%) das partículas micro (A) e nanométricas (B, C) de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 em comparação com valores recomendados pela FDA .....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>x</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
Figura 1 - Fotografia microscópica da microalga <i>Spirulina</i> sp. ....	6
Figura 2 – Fotobiorreatores onde é realizado o cultivo de <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 na planta piloto de Santa Vitoria do Palmar (Rio Grande do Sul).....	7
Figura 3 – Estrutura química do grupo heme (a) e estrutura quaternária da hemoglobina (b)...	9
Figura 4 – Estrutura da mioglobina com um grupamento heme. ....	9
Figura 5 – Esquema do processo de hemostase do ferro no organismo humano – equilíbrio entre absorção, armazenamento e perda. ....	10
Figura 6 – Diagrama comparativo de escalas dimensionais.....	15
Figura 7 – Peixe <i>Zebrafish</i> ( <i>Danio rerio</i> ).....	16
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>17</b>
<b>ILUSTRAÇÃO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO TRABALHO .....</b>	<b>18</b>
<b>Artigo I PUBLICADO NA REVISTA AFRICAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE.....</b>	<b>19</b>
Figura 1. Processo de obtenção da biomassa – da esquerda para a direita: cultivo, filtração, secagem e embalagem .....	22
Figura 2. Composição (%) de proteínas, cinzas, carboidratos, lipídios e fibra bruta em <i>Spirulina</i> sp. LEB-18.....	27
<b>Artigo II.....</b>	<b>32</b>
Figura 1. Gráficos de distribuição de tamanho das nanopartículas B (1a) e C (1b).....	38
Figura 2. Microfotografias eletrônicas das amostras microalgais em tamanhos micro (A) e nanométrico (B e C) . ....	40
<b>Artigo III.....</b>	<b>48</b>
Figura 1 – Densidade óptica de células de <i>Zebrafish</i> expostas a diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos tratamentos A, B, C nos tempos de exposição tempos 0, 24, 48 e 72 h em comparação com o tratamento controle (somente células – sem adição de amostra) 54	
Figura 2 – Viabilidade de células de <i>Zebrafish</i> expostas a diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos tratamentos A, B, C nos tempos de exposição tempos 0 (Fig. 2.1), 24 (Fig. 2.2), 48 (Fig. 2.3), e 72 h (Fig. 2.4), .....	55
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>75</b>

APÊNDICE 1 – Processo de obtenção de nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 pelo método mecânico de ultrahomogeneização ..... 76

APÊNDICE 2 – Suspensão de nanopartículas preparadas por meio da homogeneização de biomassa microalgal com solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 (b) e água destilada pH 6,9 (c), respectivamente. .... 77

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT GERAL</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
3.1. <i>Spirulina</i> sp.....	5
3.2. O micronutriente ferro .....	8
3.2.1 Absorção e metabolismo.....	10
3.2.2 Anemia ferropriva.....	11
3.2.3 Toxicidade .....	13
3.3. Fortificação de alimentos.....	13
3.4. Nanobiotecnologia.....	14
3.5. Citotoxicidade.....	15
3.5.1 <i>Zebrafish</i> como modelo de teste citotóxico .....	16
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>17</b>
<b>Artigo I-PUBLICADO NA REVISTA AFRICAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE</b> .....	<b>19</b>
<b>Artigo II</b> .....	<b>32</b>
<b>Artigo III</b> .....	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>61</b>
<b>4. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>63</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>75</b>

## **CAPÍTULO I**

RESUMO GERAL

ABSTRACT GERAL

INTRODUÇÃO

OBJETIVOS

## RESUMO GERAL

A carência de micronutrientes, conhecida como fome oculta, afeta um terço da população mundial e está relacionada, principalmente, à deficiência de vitaminas e minerais, como, por exemplo, o ferro. No Brasil, estudos conduzidos indicam que a anemia causada pela deficiência de ferro é a carência nutricional que mais prevalece no país e para a deficiência deste mineral e de outros a estratégia adotada é, geralmente, a fortificação de alimentos. A *Spirulina* sp. LEB-18 é uma microalga que demonstrou ser uma excelente fonte nutricional e potencialmente funcional, visto que possui uma variedade de micro e macronutrientes; logo, é estudada há anos por pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande. Estudos sobre nanobiotecnologia na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos são escassos, entretanto, quando ocorrem, têm como objetivo produzir sistemas mais eficientes, reduzindo em tamanho os compostos presentes na matéria-prima. Assim, o aprimoramento da nanobiotecnologia aplicada à área alimentícia com a possibilidade de desenvolvimento de produtos seguros e de maior qualidade nutricional motivou esta proposta, a qual se baseou na obtenção de micro e nanopartícula microalgais. Para isso foi utilizada como matéria-prima a biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 com granulometria máxima de 88  $\mu\text{m}$  (amostra A). A obtenção das nanopartículas ocorreu através do método de agitação mecânica (10 10<sup>3</sup> rpm por 20 min), em que 1 g da amostra A foi homogeneizada com 100 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> e pH 7 (nanopartícula B) e 1 g da amostra A homogeneizada com 100 mL de água destilada pH 7 (nanopartícula C). Constatados os diâmetros médios e o índice de polidispersão pela técnica de espalhamento de luz e a morfologia por microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram avaliadas quanto ao seu perfil nutricional, determinando-se a composição proximal, perfil de minerais e biodisponibilidade de ferro. A última etapa foi o estudo da viabilidade de células de fígado de *Zebrafish*, medida pelo método de MTT. Os resultados indicaram a viabilidade da técnica de agitação mecânica para obtenção de nanopartículas microalgais (B = 153,5 nm/C = 206,5 nm), porém estas tiveram, em grande parte, seu perfil nutricional afetado, quando comparados ao da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18. As nanopartículas, quando preparadas a partir da homogeneização da biomassa com água destilada (C), apresentam quantidade e biodisponibilidade de ferro superiores à amostra com solução tampão (B) e mais próximas ao recomendado pela *Food and Drug Administration* e como vantagem o conteúdo de sódio diminuído. Em relação à viabilidade celular, os resultados, de forma geral, não evidenciaram a toxicidade das nanopartículas C. Analisando os resultados em conjunto entre as amostras estudadas, a nanopartícula obtida a partir da ultrahomogeneização da biomassa com água destilada (C) representa uma potencial fonte alternativa para a alimentação humana no combate à anemia ferropriva.

**Palavras-chave:** biodisponibilidade, cianobactéria, ferro, macronutrientes, minerais, viabilidade celular.

## ABSTRACT GERAL

Micronutrient deficiencies or “hidden hunger” affects one-third of the world population and is mainly related to deficiency of vitamins and minerals such as iron. In Brazil, studies indicate that iron deficiency anemia is the most prevalent nutritional deficiency in the country. The usual strategy for combatting deficiencies of this and other minerals is implementation of food fortification. *Spirulina* sp. LEB-18 is a microalga which has been studied for years by researchers from the Federal University of Rio Grande because it has been shown to be an excellent nutritional and functional source of micro and macronutrients. Studies on nanobiotechnology in the area of Food Science and Technology are scarce, however those that exist are intended to produce more efficient systems by reducing the size of the present compounds of the raw material. Thus, the motivation for this proposal is the improvement of nanobiotechnology applied to the food industry with the possibility of developing of safe products with higher nutritional quality by obtaining microalgal nanoparticles analyzing their nutritional composition and cytotoxic effects. The raw material used for this was dry biomass of *Spirulina* sp. LEB-18 with a maximum particle size of 88  $\mu\text{m}$  (sample A). The nanoparticles were obtained by the method of mechanical stirring (10 rpm for 20 min  $10^3$ ) where 1 g of sample A was homogenized with 100 mL sodium phosphate buffer 0.2 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 7 (nanoparticle B) and 1 g of sample A was homogenized with 100 ml distilled water, pH 7 (nanoparticle C). Observed average diameters and polydispersity index were determined using light scattering measurement. Particle morphology was examined using scanning electron microscopy. Samples were evaluated for their nutritional profile, which determined the proximate composition, mineral profile, iron bioavailability. The last stage was to study the viability of *Zebrafish* liver cells determined by the MTT method. The results show the viability of mechanical agitation technique for obtaining microalgal nanoparticles (B = 153.5 nm / C = 206.5 nm), but the nutritional profile of these has been affected when compared to the dry biomass of *Spirulina* sp. LEB-18. Although there is a decrease in the percentage of most nutrients in the nanoparticles, when homogenization of the raw biomass is prepared with distilled water (C) the bioavailability of iron is greater than the sample prepared with the buffer solution (B) and is closer to the figure recommended by the Food and Drug Administration. With respect to cell viability, the results generally showed no toxicity of either sample of nanoparticles. Analyzing the results together between the samples studied, the nanoparticle obtained from ultrahomogeneização biomass with distilled water (C) is a potential alternative source for human consumption to combat iron deficiency anemia.

**Keywords:** bioavailability, cyanobacteria, iron, macronutrients, minerals, cell viability.

## 1. INTRODUÇÃO

*Spirulina* sp. é uma microalga do grupo de cianosquizofiteas (algas azuis), marinha ou dulcícola, cujas espécies amplamente estudadas são: *S. platensis* e *S. maxima*. Apresentam alto conteúdo de proteínas e quantidades variáveis de vitaminas K, E e do complexo B (especialmente B<sub>12</sub>) e minerais como Ca, P, Fe, Na e Mg (BRASIL, 2009). Segundo Jassby (1988) a quantidade de ferro destaca-se em relação aos demais nutrientes, sendo que cada 3 g de *Spirulina* contém em torno de 1,3 mg de ferro.

Micronutrientes, como ferro, zinco, vitamina A, entre outros, estão sendo cada vez mais utilizados na fortificação de alimentos. Trata-se de uma estratégia efetiva e complementar a outros métodos de erradicação de carências nutricionais, não implicando em grandes mudanças no comportamento dos consumidores. No Brasil, estudos conduzidos em diversos estados indicam que a anemia ferropriva é a carência nutricional mais prevalente no país, ocorrendo em 70% das crianças pré-escolares (MARQUES et al., 2012).

Anemia ferropriva é definida pela produção de eritrócitos pequenos e pela diminuição do índice de hemoglobina circulante; constitui o último estágio da deficiência de ferro e corresponde a um longo período de privação deste nutriente. De acordo com Álferez et al. (2010), essa carência ocorre principalmente em crianças, adolescentes do sexo feminino, gestantes e idosos. Conhecidamente, as principais causas desta deficiência são a depleção dos estoques de ferro, a ingestão insuficiente de alimentos ricos neste mineral e a sua baixa absorção (ADOM et al., 2010).

Constituinte normal do corpo humano, o ferro se distribui amplamente tanto nas formas orgânica e inorgânica, totalizando cerca de 3 a 4,5 g em um indivíduo adulto (~ 60 kg) e desempenhando diversas funções fisiológicas (DOMENE; ASSUMPÇÃO, 2008). A fortificação com ferro é um método complexo, pois as formas biodisponíveis são quimicamente reativas e produzem, na maioria das vezes, efeitos indesejáveis quando adicionadas aos alimentos. A complexidade na fortificação do ferro consiste na seleção de um composto que seja pouco perceptível sensorialmente e bem absorvido, ressaltando que os compostos solúveis (sais ferrosos) são melhor absorvidos e quimicamente mais reativos, enquanto outros compostos são pouco reativos e apresentam baixa biodisponibilidade em seres humanos (MARQUES et al., 2012).

O termo biodisponibilidade - relacionado ao ferro - é a medida daquela fração do ferro alimentar capaz de ser absorvida pelo trato gastrointestinal e subsequentemente armazenada e incorporada. Em diversas pesquisas o aumento da absorção de ferro foi relatado após a sua redução em micropartículas (WEGMULLER et al., 2004; COCATO et al., 2007). Rohner et al. (2007), após reduzirem compostos solúveis de ferro em nanopartículas verificaram o aumento da biodisponibilidade deste mineral em experimento com ratos.

A nanotecnologia tem como princípio a caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas na escala nanométrica, onde um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. As áreas da indústria de alimentos atualmente beneficiadas com a nanotecnologia são: desenvolvimento de materiais funcionais, processamento em micro e nanoescala, e nanossensores para a segurança alimentar. Entretanto, estes estudos são considerados recentes, quando comparados às ciências biomédicas (ASSIS et al., 2012).

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG) vêm desenvolvendo pesquisas acerca do cultivo de microalgas, especialmente a do gênero *Spirulina*, constantemente estudado devido às suas propriedades funcionais e farmacológicas. Recentemente, com o crescimento das pesquisas em nanotecnologia, e as descobertas promissoras nesta área, constatou-se uma possibilidade de melhor explorar as propriedades desta microalga. Assim, o aprimoramento da nanotecnologia aplicada na área alimentícia, com a possibilidade do desenvolvimento de produtos mais seguros e de maior qualidade nutricional, motiva esta proposta, a qual se baseia na obtenção de micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 com o objetivo de obter uma fonte alternativa ao combate de carências nutricionais, como a anemia ferropriva.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Apresentar uma alternativa tecnológica para o ingestão de nutrientes, em especial o ferro, visando à prevenção da anemia ferropriva.

### 2.2. Objetivos específicos

Obter micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18;

Caracterizar o tamanho médio e a morfologia das micro e nanopartículas obtidas;

Avaliar a influência da nanotecnologia sobre a composição proximal e perfil de minerais de partículas de *Spirulina* sp. LEB-18 (nos tamanhos micro e nanométrico);

Determinar, através de ensaios *in vitro*, a biodisponibilidade de ferro das micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18;

Estudar a citotoxicidade de micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. *Spirulina* sp.

A utilização de micro-organismos e de seus produtos metabólicos pelo homem é um dos campos mais expressivos da biotecnologia. É muito importante o conhecimento da atividade destes micro-organismos na conversão de determinadas substâncias em outras, como também da possibilidade do uso de substratos para obtenção de produtos e subprodutos viáveis (COLLA et al., 2008).

O crescente interesse em cianobactérias, fungos e bactérias deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica, dentre outras.

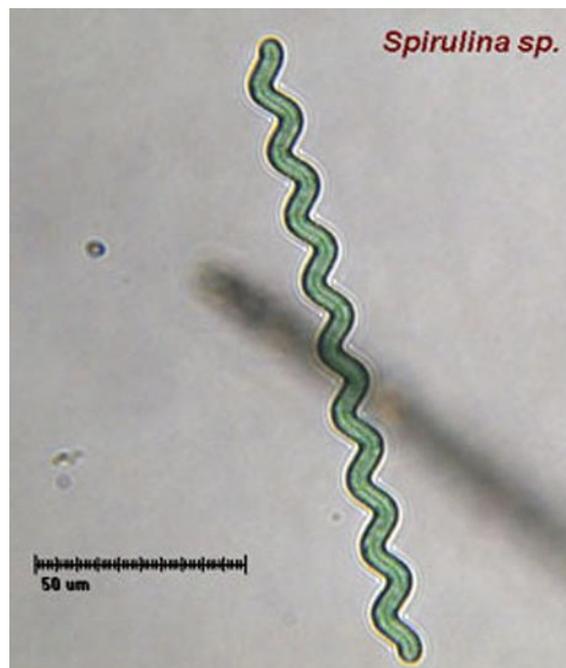
As cianobactérias ou algas cianofíceas são organismos pertencentes ao reino Monera. São procariontes tendo, portanto, o material genético disperso na célula (DERNER, 2006). São micro-organismos fotossintéticos, os quais crescem em meio líquido e se reproduzem rapidamente, podendo multiplicar sua biomassa em períodos de 24 h, gerando compostos biologicamente ativos, como proteínas. O interesse no cultivo destes organismos fundamenta-se em suas variadas e possíveis aplicações tais como alimentação, produção de energia química, extração de pigmentos, entre outras substâncias celulares de interesse industrial e no tratamento de águas residuárias (BURJA et al., 2001).

O interesse na exploração das cianobactérias para produção em larga escala para alimentação humana deve-se também à sua alta taxa de crescimento, resultando em elevada produção de nutrientes, particularmente proteínas, e à capacidade de utilizarem como substrato fontes energéticas de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Estes aspectos determinam vantagens tecnológicas e comerciais em relação a técnicas convencionais de produção de proteína (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

A microalga *Spirulina* sp. é uma cianobactéria filamentosa que forma tricomas cilíndricos multicelulares de 1 a 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro e se dispõem em forma espiralada, atingindo até 1 mm de comprimento (Figura 1). Através da fotossíntese a *Spirulina* sp. converte os nutrientes do meio em material celular, liberando oxigênio. A

*Spirulina* sp. tem envoltório celular mais parecido com uma bactéria do que com uma alga, ou seja, suas paredes celulares são mais digeríveis uma vez que são formadas por mucopolissacarídeos e não por celulose, o que representa vantagem do ponto de vista de preservação da integridade de componentes, como vitaminas e ácidos graxos poli-insaturados (COLLA, 2008).

**Figura 1 - Fotografia microscópica da microalga *Spirulina* sp.**



Fonte: Universidade de Victoria, Canadá, 2005.

Uma das cepas de *Spirulina* estudadas na Universidade Federal do Rio Grande (FURG) é a LEB-18, isolada da Lagoa Mangueira e cultivada em meio padrão desenvolvido por Zarrouk (1996), fornece (entre outros nutrientes) carbono inorgânico na forma de  $\text{CO}_3^{2-}$  e  $\text{HCO}_3^-$  que se convertem em  $\text{CO}_2$  utilizado na fotossíntese. A *Spirulina*, ao contrário de outras cianobactérias, apresenta baixa susceptibilidade à contaminação de seus cultivos por outros micro-organismos devido ao alto pH em que se desenvolve, de modo que os fotobiorreatores para o cultivo podem ser abertos, sendo geralmente na forma retangular com cantos arredondados. A temperatura ótima de crescimento oscila em torno de 35 °C. Abaixo, através da Figura 2, pode-se visualizar a planta piloto

estruturada pelos grupos de pesquisa da FURG para cultivo de *Spirulina* sp. (MORAIS et al., 2008).

**Figura 2 – Fotobiorreatores onde é realizado o cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18 na planta piloto de Santa Vitoria do Palmar (Rio Grande do Sul)**



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica, 2014.

A utilização da *Spirulina* sp. na alimentação deve-se à sua composição química, que por sua vez proporciona efeitos nutricionais e potencialmente funcionais ao consumidor (MORAIS et al., 2008). Conforme a *Food and Drug Administration* (FDA) (2014) esta microalga apresenta em sua constituição 53-62% de proteínas; 17-25% de carboidratos; 4-6% de lipídios; 8-13% de minerais e 3-6% de umidade.

Assim, atribui-se grande importância nutricional à *Spirulina* sp. devido à variedade de macro e micronutrientes que contém. Pode-se dizer que a *Spirulina* sp. é um alimento com maior variedade de nutrientes por unidade de peso, sendo que 20 g desta microalga são suficientes para satisfazer as necessidades nutricionais diárias do organismo humano. Estudos demonstraram que esta cianobactéria apresenta além do teor protéico em torno de 60% de proteína bruta, vitaminas, minerais e diversas substâncias bioativas (MOREIRA et al., 2013).

Os minerais, zinco, magnésio, cromo, selênio e ferro estão presentes na biomassa (BECKER, 2004). Segundo Jassby (1988) a quantidade de ferro destaca-se em relação aos demais. O mesmo autor relata que 12 g de *Spirulina* sp. seriam suficientes

para suprir as necessidades diárias do mineral no organismo. Conforme dados dispostos pela FDA (2014) cada 3 g de *Spirulina* sp. contém cerca de 1,3 mg de ferro.

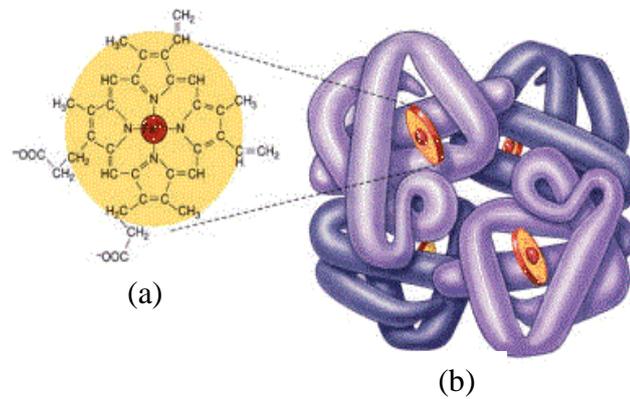
### **3.2. O micronutriente ferro**

O ferro é um dos micronutrientes mais estudados e melhor descritos na literatura, participando de importantes processos metabólicos no organismo humano, tais como: transporte e armazenamento de oxigênio, síntese de DNA e RNA, transporte de elétrons, respiração e regulação da expressão gênica. A atividade biológica deste mineral está relacionada às suas características químicas e ao estado de oxidação (THEIL, 2004; MACHADO et al., 2005).

Este micronutriente está presente no organismo humano, principalmente, na hemoglobina, o restante distribui-se na composição de outras proteínas, enzimas e formas de depósito. A quantidade total em média de ferro existente no organismo humano é de 3,8 g no homem e 2,3 g na mulher, sendo que os compostos de ferro encontram-se agrupados em duas categorias: compostos essenciais de ferro (hematínico/heme/orgânico) e compostos de armazenamento de ferro (não hematínico/não heme/inorgânico). De forma geral, o teor de ferro no organismo de um homem adulto pode ser distribuído em 70% de hemoglobina e mioglobina e os 30% restantes pelo fígado, baço e medula óssea (ferritina, hemossiderina, ferro orgânico remanescente) (MOURA, 2006).

A hemoglobina é a mais abundante e fácil de estudar das proteínas heme; 68% do ferro do organismo estão presentes nela; forma mais de 95% das proteínas das hemáceas e mais de 10% do peso total do sangue. Sua função consiste em transportar oxigênio pela corrente sanguínea. É um tetrâmero formado por quatro cadeias de globina e cada uma delas contém um átomo de ferro (PERES, 1996) (Figura 3).

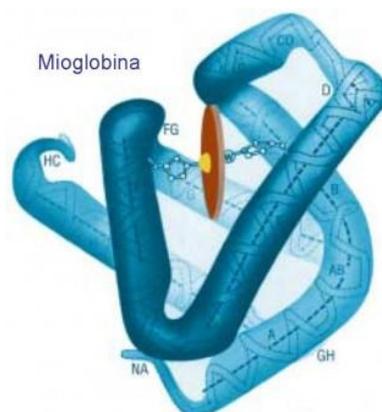
**Figura 3 – Estrutura química do grupo heme (a) e estrutura quaternária da hemoglobina (b).**



Fonte: Laboratory of Biomolecular Systems, 2014.

A mioglobina transporta e armazena o oxigênio utilizado durante a contração muscular. Sua estrutura é similar às unidades monoméricas da hemoglobina, sendo formada por uma única cadeia de globina unida a um grupo heme que contém um átomo de ferro (PERES, 1996) (Figura 4).

**Figura 4 – Estrutura da mioglobina com um grupamento heme.**



Fonte: Laboratory of Biomolecular Systems, 2014.

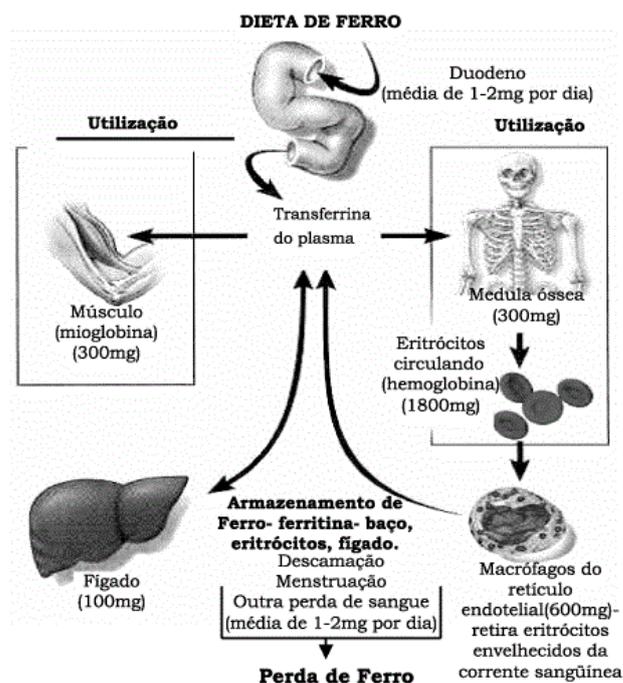
As principais formas de armazenamento de ferro pelo organismo humano são a ferritina e a hemossiderina, as quais se encontram no fígado, células reticuloendoteliais

e medula óssea. Em relação ao ferro total, no organismo as formas de reserva representam 12% nas mulheres e 25% nos homens. A ferritina é uma proteína de armazenamento formada por uma cadeia de 24 polipeptídios que se agrupam em círculos ao redor de fosfato férrico hidratado. À medida que o suprimento de ferro aumenta, o nível de ferritina intracelular se eleva para acomodar a reserva de ferro e outra quantidade é encaminhada à corrente sanguínea. A hemossiderina é um grupo heterogêneo de grandes agregados de proteína-sal-ferro (MAHAN; ESCOTTI-STUMP, 2010).

### 3.2.1 Absorção e metabolismo

Em mamíferos a absorção de ferro ocorre principalmente no intestino delgado proximal. Em condições normais, a quantidade absorvida não deve exceder a quantidade perdida diariamente pelas vias fisiológicas. Uma vez absorvido, o ferro é avidamente retido pelo organismo, sendo o controle da absorção intestinal o principal meio de regulação do seu estoque (MACHADO et al., 2005) (Figura 5).

**Figura 5 – Esquema do processo de hemostase do ferro no organismo humano – equilíbrio entre absorção, armazenamento e perda.**



Fonte: Alimentação e Saúde Infantil, 2014.

O mecanismo de absorção do ferro hematínico difere daquele do ferro não hematínico. O ferro hematínico, altamente biodisponível e pouco afetado por fatores dietéticos, é catabolizado no lúmen intestinal e a porção heme é absorvida pelos enterócitos como metaloporfirina. Então, nos enterócitos, o radical heme é degradado pela enzima heme-oxigenase e o ferro é liberado ao organismo.

O ferro não hematínico é insolúvel em água e tem sua absorção limitada pela composição da dieta. Substâncias como fosfatos, taninos, polifenóis e oxalatos, por formarem complexos insolúveis de ferro, e até mesmo outros minerais, como o cálcio (COOK et al., 1991; LOBO e TRAMONTE, 2004), são exemplos de limitantes na absorção do mineral. Presente nos alimentos, principalmente na forma férrica, após a digestão, pela ação do ácido clorídrico do suco gástrico, a molécula é reduzida a uma forma ferrosa, mais facilmente absorvida. Apesar de ambas as formas serem solúveis no pH ácido do estômago, apenas o ferroso permanece solúvel no duodeno.

Segundo Carvalho et al. (2006), no estômago, tanto o ferro hematínico como o não hematínico são liberados do alimento e rapidamente formam complexos solúveis e insolúveis. No intestino, os compostos de ferro solúveis são absorvidos pela membrana. Após, o ferro pode ser armazenado como ferritina no citosol da célula intestinal, podendo retornar ao lúmen intestinal por descamação natural, ou ser rapidamente transportado através da célula e entrar no fluido intracelular e no plasma.

Quando os níveis de ferro absorvidos pela dieta são adequados, a mucosa intestinal regulariza a sua absorção para manter constante o conteúdo de ferro no organismo, desta forma, cerca de 5 a 10% do mineral ingerido são absorvidos diariamente. As quantidades médias diárias necessárias para adultos e lactantes é de 14 mg e 15 mg de ferro, respectivamente. Na gestação, principalmente no segundo e terceiro trimestres, são necessários 30 mg de ferro por dia. Já para lactantes e crianças de 6 meses a 10 anos a necessidade diária é de 15 e 10 mg de ferro, respectivamente (BRASIL, 1998).

### **3.2.2 Anemia ferropriva**

A anemia por deficiência de ferro é, isoladamente, a mais frequente das deficiências nutricionais do mundo e ocorre como resultado de perda sanguínea crônica; ingestão e/ou absorção deficiente, e aumento de volume sanguíneo. Neste caso ocorre a

diminuição dos níveis plasmáticos de ferro, ou seja, os locais de armazenamento do mineral estão depletados e, portanto, não podem fornecê-lo para o plasma (CARVALHO et al., 2006).

A anemia ferropriva é o último estágio das consequências da deficiência de ferro no organismo. A falta de ferro faz com que haja diminuição no nível da hemoglobina ou ainda diminuição no número de eritrócitos no sangue, uma vez que é um elemento essencial para a síntese dessas estruturas (PANATO et al., 2011). Segundo o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF, 1998) estima-se que 90% dos casos de anemia no mundo sejam causadas devido à deficiência de ferro.

No Brasil, segundo pesquisa 50% das crianças em idade pré-escolar (4,8 milhões) em diferentes regiões do País (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Neuman et al. (2000), em estudo realizado na região sul, encontraram prevalência de anemia ferropriva em 54% de uma amostra com crianças menores de 2 anos. Na região Nordeste, segundo Oliveira et al. (2002), a prevalência de anemia ferropriva encontrada em crianças com idades entre 6 meses e 5 anos foi de 36%.

Em 2003, na pesquisa abrangendo crianças de 6 a 12 meses de idade realizada por Miranda et al., constatou-se prevalência de anemia ferropriva em 61%. Duarte et al. (2007) encontraram prevalência de anemia ferropriva em 42% de crianças menores de 2 anos. Panato et al. (2011) avaliaram o estado nutricional de crianças de 7 a 59 meses de uma clínica pediátrica do Hospital Municipal de Maringá, nas quais observaram a prevalência de anemia ferropriva em 71%.

Segundo Álferez et al. (2010) esta carência nutricional prevalece em crianças menores de 5 anos, lactentes, mulheres em idade fértil e idosos. Em condições normais, quando não ocorrem perdas sanguíneas ou processo de gestação, a quantidade de ferro presente no organismo é altamente preservada, sendo baixa a quantidade perdida a cada dia. Descartadas as situações de perda sanguínea ou gestação, os motivos possíveis para o aparecimento da anemia são defeitos na liberação das reservas, excreção aumentada, absorção incompleta e/ou ingestão inadequada, sendo esta última a principal causa (CARVALHO et al., 2006; SILVA et al., 2007).

A deficiência apresenta como principais sintomas a fadiga, prejuízo no crescimento e no desempenho muscular, irritabilidade, falta de interesse e dificuldade no

aprendizado. Além disso, alterações no crânio e demais ossos podem ocorrer em casos de longa duração do estado anêmico.

### **3.2.3 Toxicidade**

Apesar de essencial, Fe em excesso pode trazer prejuízo ao organismo. Por apresentar um alto potencial reativo, quando em demasia, tem-se atribuído ao ferro sua participação no desenvolvimento de carcinogênese, aterosclerose e desordens neurodegenerativas, como mal de Parkinson e Alzheimer (CONNOR, 1992).

Segundo Machado et al. (2005), o Fe em excesso pode gerar espécies altamente reativas de oxigênio, as quais podem produzir danos ao DNA, prejudicando a síntese de proteínas, lipídeos e carboidratos; ativação de proteases e alterações na proliferação celular. Ainda, o ferro livre pode reagir com ácidos graxos insaturados e induzir à peroxidação lipídica, promovendo danos à integridade celular.

Conforme Moura (2006) o excesso de ferro (hemossiderose ou hemacromatose) favorece a peroxidação lipídica e depleta reservas de vitamina C. Na hemacromatose ocorre a deposição patológica de ferro em determinados órgãos, sendo o fígado o primeiro a ser comprometido e o seu diagnóstico definitivo é a biópsia hepática, podendo evoluir para cirrose. Também pode ocorrer deposição de melanina e hemossiderina na camada basal da pele e cardiomiopatia.

### **3.3. Fortificação de alimentos**

De acordo com a Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998 do Ministério da Saúde do Brasil, a fortificação ou enriquecimento de alimentos são termos que se utilizam para o processo de adição de um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar seu valor nutritivo e ou prevenir ou corrigir deficiência(s) demonstrada(s) em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma (BRASIL, 1998).

A fortificação de alimentos constitui medida de baixo custo, de rápida aplicação e alta efetividade e flexibilidade, sendo socialmente aceita, uma vez que não interfere no modelo alimentar da população, pois utiliza alimentos de uso corrente. Além disso, os riscos de efeitos colaterais e toxicidade são mínimos, pois as doses de

fortificante adicionadas aos alimentos são pequenas e controladas (VELLOZO et al., 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são reconhecidos quatro tipos de fortificação: “em massa ou universal” que consiste na adição de micronutrientes aos alimentos consumidos pela grande maioria da população, sendo regulada pelos governos. É indicada em países onde diferentes grupos populacionais apresentam risco elevado para desenvolver determinada patologia associada à carência nutricional; “em mercado aberto”, por iniciativa da indústria de alimentos em fortificar seus produtos, com o objetivo de aumentar seus lucros; “direcionada”, que consiste na fortificação de alimentos consumidos por grupos de alto-risco; “comunitária ou domiciliar”, uma abordagem que está sendo explorada em países em desenvolvimento, em que são adicionados suplementos às refeições das crianças (SAMPAIO, 2009).

Em relação à fortificação de alimentos com sais de ferro, uma das estratégias propostas pela Organização Mundial da Saúde no combate à anemia por deficiência deste mineral, tem como principais vantagens alcançar diversos segmentos da população e não requerer a cooperação do indivíduo. No Brasil, em 13 de dezembro de 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tornou obrigatória a fortificação de farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico (BRASIL 2002).

### **3.4. Nanobiotecnologia**

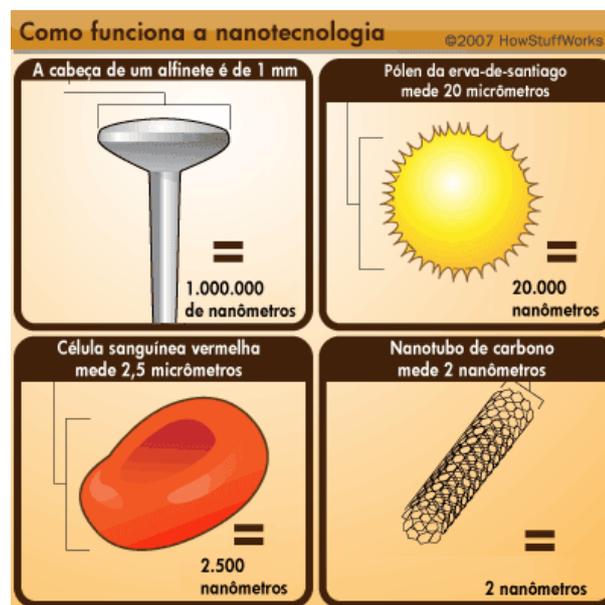
A noite de 29 de dezembro de 1959 é um marco para a nanociência. Nesta data o físico norte-americano e futuro prêmio Nobel, Richard Feynman, proferiu a palestra “Há mais espaços lá embaixo” que revolucionou os estudos sobre partículas infinitamente pequenas. O tema da palestra pareceu hermético mesmo frente a uma plateia de físicos. Desde a palestra muito já foi feito, inclusive no que diz respeito à criação de equipamentos que permitem “ver” o átomo, entretanto, essa continua sendo uma área de muitas possibilidades em vários campos do conhecimento (ALMEIDA et al., 2004).

A aplicação da nanobiotecnologia em alimentos é recente em comparação com a área biomédica e as indústrias de tecnologia de informação, onde essa ciência já é bastante utilizada na fabricação de nanomateriais. No entanto, existem inúmeras oportunidades que podem ser exploradas na indústria de alimentos, como a elaboração de

produtos com características funcionais, desenvolvimento de processos e embalagens inteligentes e/ou bioativas (CHAU et al., 2007; SAHOO et al., 2007).

Geralmente as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 200 nm. No entanto, partículas com diâmetro em torno de 60 a 70 nm ou mesmo inferiores a 50 nm podem ser obtidas, dependendo da aplicação (SCHAFFAZICK et al., 2003). De acordo com Sanguansri e Augustin (2006), a nanotecnologia trabalha com materiais de produção, aplicação e processamento de tamanhos menores que 1000 nm. Santos-Magalhães et al. (2000), Lboutounne et al. (2002) e Wadhwa et al. (2012) trabalharam com partículas nanométricas na faixa de tamanho de 50 a 300 nm. Outros autores definem que a nanotecnologia trabalha com tamanho na ordem de até 100 nm (ROCO, 2003; AZEREDO, 2009), materiais esses menores que células animais e vegetais (Figura 6).

**Figura 6 – Diagrama comparativo de escalas dimensionais.**



Fonte: Bonsor; Strickland (2014).

### 3.5. Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios para a avaliação da potencialidade de aplicação clínica e tecnológica de um novo material. Dentre eles, o teste do MTT é um dos mais aplicados.

O MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue) é o sal que, após clivagem por desidrogenases mitocondriais de células, torna-se insolúvel em água pela formação de cristais de “formazan” e solúveis em solventes orgânicos. Em meio de cultura com células, após adição de Dimetil Sulfóxido (DMSO), o MTT convertido em “formazan” é solubilizado e pode ser determinado por espectrofotometria. Esta reação pode ser expressa em percentual de células vivas de acordo com a absorbância, obtendo-se o percentual da viabilidade celular (CASTRO et al., 2004).

### 3.5.1 Zebrafish como modelo de teste citotóxico

A utilização de animais não mamíferos tem oferecido uma alternativa na elucidação de mecanismos de toxicidade de substâncias químicas, dentre os quais o peixe teleósteo, popularmente conhecido como Zebrafish (*Danio rerio*) (KOKEL e PETERSON, 2008) (Figura 7). Características como tamanho pequeno e fácil reprodução favorecem o baixo custo de produção e manutenção desses animais de laboratório, impulsionando o seu uso em pesquisas de diversas áreas, como genética, farmacologia e neurociência. Além disto, Zebrafish e mamíferos apresentam respostas fisiológicas similares a diversos estímulos (WEBER, 2013).

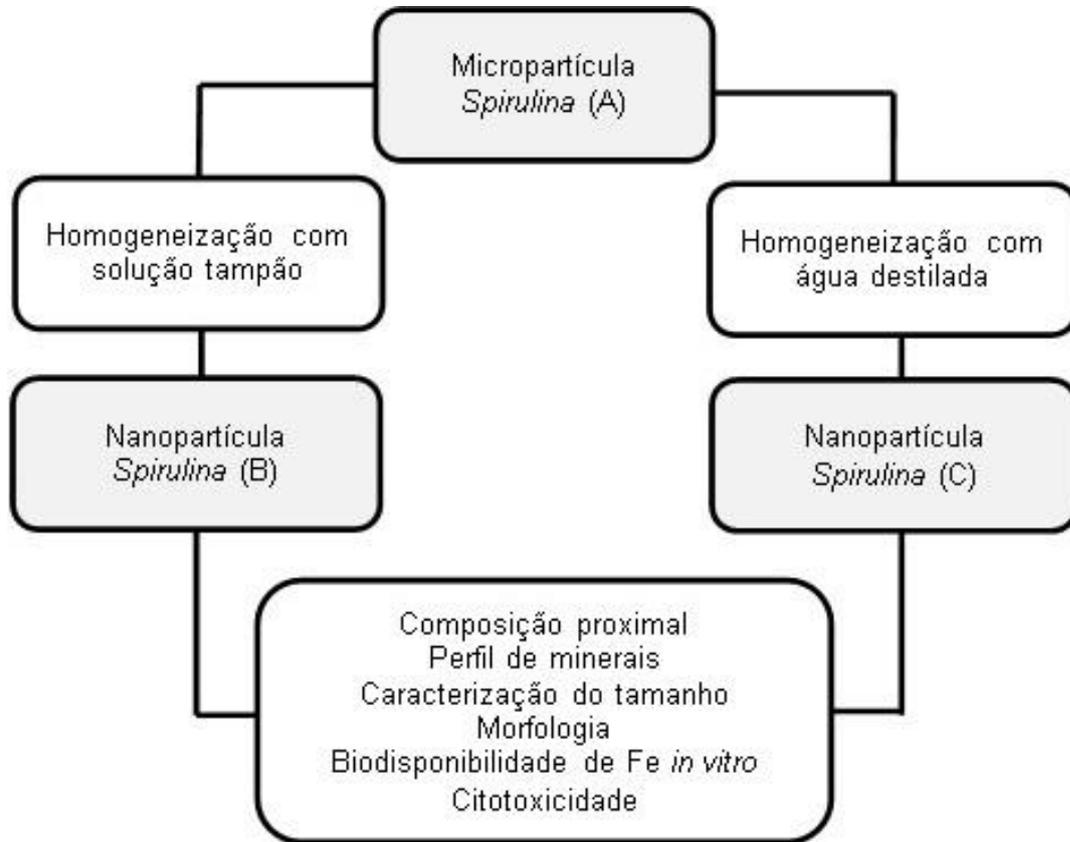
**Figura 7 – Peixe Zebrafish (*Danio rerio*)**



Fonte: Nature Reviews, 2014.

### **CAPÍTULO III**

#### **DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

**ILUSTRAÇÃO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO TRABALHO**

**Artigo I**

**PUBLICADO NA REVISTA AFRICAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE**

## **Biomassa de *Spirulina* sp. cultivada no Sul do Brasil como fonte de minerais essenciais e outros nutrientes**

*Resumo:* Este estudo teve como objetivo determinar elementos químicos de grande importância nutricional na biomassa de *Spirulina* sp. Cepa LEB-18, a qual é de ocorrência natural nas margens da Lagoa Mangueira, ao sul do Brasil. O cultivo da microalga foi realizada em meio padrão Zarrouk. Quando a concentração microalgal atingiu 0,5 g L<sup>-1</sup>, a biomassa foi separada por filtração e seca a 50 °C durante 5 h. A biomassa colhida foi moída em moinho de bolas, peneirada para as partículas alcançarem até 88 µm, pesada em triplicata (~300 mg) e digerida com HNO<sub>3</sub> concentrado para quantificação subsequente. O conteúdo mineral foi determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Outros nutrientes foram determinados por técnicas analíticas conforme metodologia da AOAC (2000). Os macrominerais presentes em maior concentração (µg g<sup>-1</sup>±DP) foram cálcio (15108±529), sódio (19486±99) e potássio (14036±109). O micromineral encontrado em maior quantidade foi o ferro (956 µg g<sup>-1</sup>±9). Demais nutrientes estavam presentes na seguinte ordem: proteína (58,5%), cinzas (12%), carboidratos (7,5%), lípidios (7%) e fibra bruta (0,95%). Os resultados foram comparados com os valores de minerais para *Spirulina* sp. para consumo humano, recomendados pela *Food and Drug Administration* e também com a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de minerais pela Legislação Brasileira. Os resultados mostraram-se promissores para o uso da *Spirulina* sp. LEB-18 como uma fonte alternativa de minerais essenciais e outros nutrientes para o corpo humano.

Palavras chaves: Cianobactéria, elementos químicos, importância nutricional, espectrometria de emissão óptica.

### **INTRODUÇÃO**

Microalgas têm estado presentes há milhares de anos na vida da população mundial, principalmente sob a forma de medicamentos, mas nas últimas décadas, a engenharia bioquímica tem se dedicado ao desenvolvimento de novos métodos para o processamento destas como alimentos. Atualmente, cultivadas em sistemas de grande escala,

são fontes economicamente viáveis de proteína para o uso em alimentos, porque muitas vezes atende às exigências deste nutriente na dieta (Zepka et al. 2010).

As cianobactérias como uma fonte de proteína apresentam certas vantagens sobre a utilização de outros micro-organismos devido ao seu crescimento, à quantidade e à qualidade da proteína biodisponível. Entre as cianobactérias está a do gênero *Spirulina*, que contém cerca de 60 a 70% de proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos recomendados pela Organização Mundial da Saúde. Ela também contém beta-caroteno, ferro absorvível e outros minerais, bem como níveis elevados de vitaminas, compostos fenólicos, ácido gama-linolénico e outros ácidos graxos essenciais (Belay et al., 1993; Moreira et al., 2012).

*Spirulina* sp. é comercializada e consumida na Alemanha, Brasil, Chile, Espanha, França, Canadá, Bélgica, Egito, Estados Unidos, Irlanda, Argentina, Filipinas, Índia, África e outros países onde a administração pública, os órgãos sanitários e associações aprovaram o uso na alimentação humana (HENRIKSON, 1994). Algumas das maiores empresas do mundo produtoras de *Spirulina* são a Earthrise Farms (EUA), Cyanotech (EUA), Hainan DIC Microalgas (China), Marugappa Chettir (Índia), Genix (Cuba) e Solarium Biotecnologia (Chile) (Belay, 1997).

Atualmente a Universidade Federal do Rio Grande (FURG) cultiva a microalga *Spirulina* sp. para incluí-la na dieta humana, em especial a cepa LEB-18. Em termos de estudos nutricionais, esta cepa teve seus perfis de ácidos graxos (Radmann e Costa, 2008) e teores de aminoácidos e de metais pesados (Morais et al. 2009) analisados e comparados com os valores aceitos internacionalmente pela (FDA). Dentro deste contexto, este estudo tem como objetivo determinar o teor de alguns minerais essenciais (Ca, P, Mg, Na, P, S, Cr, Fe, Zn, Mn, Cu) e outros componentes nutricionais (proteínas, cinzas, carboidratos, lipídios e fibra bruta) na biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, e assim contribuir com a sua possível aplicação em alimentos a fim de combater as deficiências nutricionais.

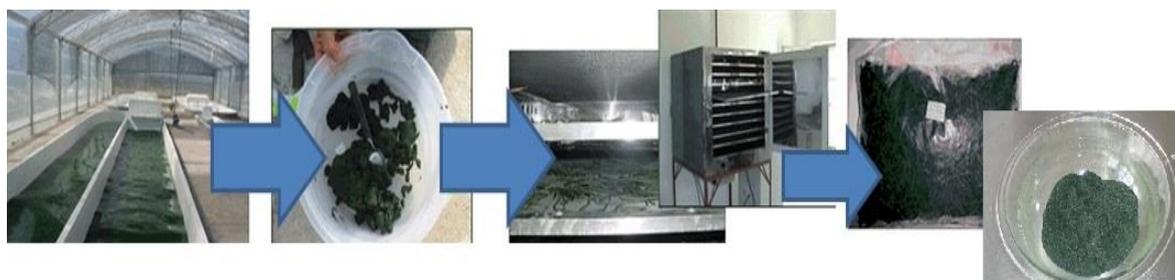
## **MATERIAL E METODOS**

### **Obtenção e preparo da biomassa microalgal**

Para desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a biomassa seca da microalga *Spirulina* sp. LEB-18, cedida gentilmente pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande. Sua produção é realizada na Planta Piloto localizada as margens da Lagoa Mangueira, no município de Santa Vitória do

Palmar, RS (33° 30' 13'' S e 53° 08' 59'' W). A unidade consiste de 3 tanques abertos tipo *Raceway* de 10.000 L e 1 tanque aberto tipo *Raceway* de 1.000 L para propagação do inóculo. Os cultivos são cobertos por túnel de filme transparente com proteção contra raios UV e expostos a condições ambientais naturais. Quando a microalga atinge a concentração de 0,50 g L<sup>-1</sup>, sua biomassa é separada através de filtração e seca em secador de bandejas a 50 °C por 5 h (Morais et al., 2008). A biomassa obtida foi triturada em moinho de bolas (Quimis®) e peneirada em agitador de peneiras eletromagnético (Quimis®) até alcançar granulometria máxima de 88 µm (Tyler 170) (Cremasco, 2012) (Figura 1).

**Figura 1. Processo de obtenção da biomassa – da esquerda para a direita: cultivo, filtração, secagem e embalagem**



Fonte: adaptado de LEB-FURG, 2011.

### Preparação da amostra e determinação de minerais

A amostra foi pesada (~300 mg) em triplicata e feita a digestão em forno de micro-ondas modelo Speedwave Four (Berghof, Alemanha), em frascos de TFM. Para a digestão foram usados 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e bidestilado (Merck) e 0,5 mL de HF 40% (Merck). O programa de aquecimento está descrito na Tabela 1. Após a digestão, a amostra foi diluída entre 5 e 500 vezes em HNO<sub>3</sub> 5%, para posterior quantificação por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

**Tabela 1. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas.**

Etapas	Rampa (min)	T (°C)	Tempo de permanência (min)	Pressão (bar)
1	20	170	10	35
2	5	200	25	35
3	5	50	20	35

As determinações foram feitas em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado Perkin Elmer (modelo Optima 4300 DV, Shelton, USA), com vista axial. As demais condições de operação do equipamento estão descritas na Tabela 2. O plasma foi gerado a partir de argônio (White Martins, São Paulo, Brasil), com pureza de 99,996%.

**Tabela 2. Condições de operação do equipamento de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado**

Parâmetro	Condição
Potência (W)	1400
Vazão do gás principal (L min <sup>-1</sup> )	15
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,2
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,7
Comprimento de onda (nm)	Ca 315,887
	Fe 238,204
	K 766,490
	Mg 279,077
	Na 588,995
	P 214,914
	S 181,975
	Cr 267,717
	Cu 324,759
	Mn 259,374
Zn 213857	

### Composição proximal

A biomassa microalgal foi analisada conforme métodos oficiais descritos por *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000). Lipídios totais foram determinados segundo metodologia de Bligh e Dyer (1959).

### Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado na Tabela 3, os macrominerais analisados apresentam-se na biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 na seguinte ordem decrescente: cálcio, sódio, potássio, fósforo, enxofre e magnésio. Dentre os microminerais, o ferro é o que se encontra em maior quantidade, seguido por manganês, zinco, cobre e cromo. Para análise da amostra, comparando-se seus dados com aqueles recomendados pela FDA (2011), a qual estabelece valores de nutrientes necessários para que a *Spirulina* sp. esteja adequada para consumo humano. Como também será utilizada como referência a Ingestão Diária Recomendada (IDR) estabelecida pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2005). Neste último caso, ou seja, comparação com a IDR, utilizaremos sempre o maior valor, seja ele recomendado para adultos ou crianças.

O cálcio é um mineral essencial necessário para realização de diversas funções biológicas. Estudos têm demonstrado a associação entre o baixo consumo de cálcio e doenças crônicas, como osteoporose, câncer de colón, hipertensão arterial e obesidade. Entretanto, grande parte da população brasileira apresenta consumo de cálcio abaixo do recomendado ( $10^6 \mu\text{g}$  ao dia por indivíduo adulto) (Brasil, 2005). A amostra da pesquisa, *Spirulina* sp. LEB-18 apresenta  $15108 \mu\text{g g}^{-1}$ , ou seja, 66 g de biomassa supririam a necessidade diária de cálcio.

O sódio, normalmente encontrado nos alimentos sob a forma de sal (cloreto de sódio), também é um mineral essencial às diversas funções vitais do organismo: contração muscular, manutenção da pressão arterial, transmissão nervosa e equilíbrio de fluidos. Atualmente, se tem conhecimento de que um elevado consumo deste mineral pode desencadear diversas disfunções no organismo. Foram observadas evidências da associação entre o alto consumo de sódio e doença cardiovascular e acidente vascular cerebral, independentes ou associadas com aumento da pressão arterial (Sarno, 2010). Na amostra estudada por nosso grupo de pesquisa foram encontrados  $19486 \mu\text{g.g}^{-1}$ , valor superior ao estabelecido para *Spirulina* sp. pela FDA.

Manutenção de líquidos intracelulares, contração muscular, condução de estímulos, controle da frequência cardíaca, produção de energia e síntese de proteínas e ácidos nucléicos são algumas das funções do macroelemento potássio. Um indivíduo adulto, considerado sadio, necessita de  $2000000 \mu\text{g}$  de potássio/dia para a realização das atividades

citadas anteriormente, o que poderia ser atingido com o consumo de 143 g de *Spirulina* sp. LEB-18.

**Tabela 3. Conteúdo de minerais em *Spirulina* sp. LEB-18 ( $\mu\text{g g}^{-1}\pm\text{DP}$ ) em comparação com valores preconizados pela *Food and Drug Administration* (FDA) em *Spirulina* sp. Para consumo humano ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e recomendação de consumo diário (RDI) de minerais para crianças e adultos ( $\mu\text{g}$ ).**

Mineral	LEB-18		FDA	RDI para crianças*	RDI para adultos
	MÉDIA	DP			
Macrominerais					
Na	19486	99	14000	-	500000
Ca	15108	529	4667	500000 – 700000	1000000
K	14036	109	18667	-	2000000
P	8736	19	10000	460000 – 1250000	700000
Mg	4722	83	7667	60000 – 100000	260000
S	6764	323	-	-	-
Microminerais					
Fe	956	9	533	6000 – 9000	14000
Mn	106	2	32	1200 – 1500	2300
Zn	35,4	0,8	27	4100 – 5600	7000
Cu	11,9	0,2	7	340 - 440	900
Cr	4,07	0,2	-	11 – 15	35

\*Crianças de 1 a 10 anos.

Como mencionado anteriormente, o fósforo, enxofre e magnésio também são componentes vitais ao organismo. O fósforo participa da formação de energia para reações celulares na forma de ATP (Adenosina trifosfato), forma ossos e dentes, entre outras funções (Braga e Mendonça, 2010); o enxofre participa da estrutura de muitas proteínas; e o magnésio é constituinte de muitas coenzimas e essencial para o funcionamento normal dos nervos e músculos. Fósforo, enxofre e magnésio foram encontrados, respectivamente, na biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 nas concentrações de 8,7; 6,7 e 4,7  $\mu\text{g g}^{-1}$ , o que corresponde a 1,2%; 12,3% e 1,8% da IDR dos respectivos minerais. Os valores de fósforo e magnésio presentes na amostra se encontram um pouco abaixo do preconizado pela FDA em *Spirulina* para alimentação humana, já o teor de enxofre não é citado pela legislação americana, não sendo possível a comparação das biomassas.

Analisando os micronutrientes determinados na biomassa de *Spirulina* LEB-18, observa-se que, quando comparados aos dados preconizados pela FDA, quatro deles (ferro, manganês, zinco e cobre) são encontrados em quantidade superior. O teor de cromo não foi citado pela FDA (2011). O ferro recebe grande destaque. Cada 1 g de biomassa corresponde a 6,8% da IDR para adultos e 10,5 – 16% da IDR para crianças.

O ferro é um nutriente essencial presente em diversos alimentos. Entre 60 – 70% do ferro total presente em seres humanos encontra-se associado à hemoglobina. Existem vários alimentos ricos em ferro e entre eles, estão: germe de trigo, folha da salsa, aveia, espinafre, arroz, leguminosas em geral, cenoura, couve, repolho, entre outros. As concentrações de ferro encontradas em cereais e em grãos não diferem muito, sendo que a média comum entre eles é de 25 a 80  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Venezuela, 2001). Tomando-se como referência alimentos conhecidos mundialmente como fonte de ferro, tais como fígado cru (56  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); feijão rajado cru (18,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e açúcar mascavo (8,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Taco, 2011), tem-se a *Spirulina* sp. LEB-18 como uma fonte bem mais representativa do mineral.

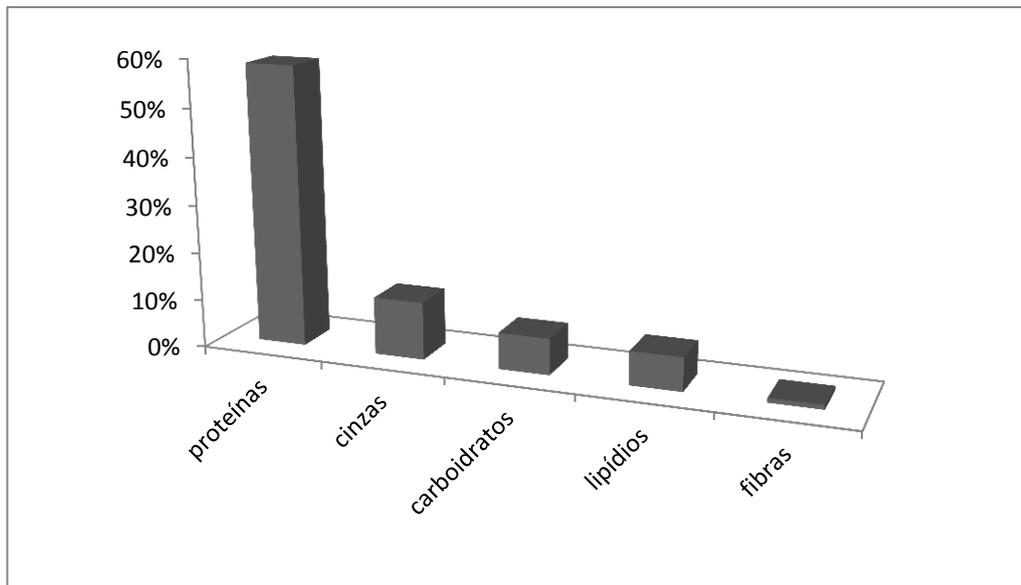
No mundo biológico, o manganês está associado à formação de tecido conjuntivo e ósseo, crescimento e reprodução e metabolismo de carboidratos e lipídios. O zinco, como um componente estrutural e/ou funcional de várias metaloenzimas e metaloproteínas, participa de muitas reações do metabolismo celular, incluindo processos fisiológicos, tais como função imune, defesa antioxidante, crescimento e desenvolvimento (Mafra e Cozzolino, 2004; Pedraza et al., 2011). O cobre pode ser encontrado nos tecidos biológicos sob a forma de complexos orgânicos, como as metaloproteínas que possuem atividade enzimática. A utilização de oxigênio durante a respiração celular, utilização de energia e síntese de compostos essenciais são exemplos de reações metabólicas intermediadas por enzimas que requerem a presença de cobre para apresentarem atividade catalítica (Venezuela, 2001). Desta forma, estes minerais, apesar de serem necessários em baixas concentrações, são considerados essenciais ao metabolismo humano.

Nesta pesquisa, a *Spirulina* sp. LEB-18 também se mostrou uma excelente fonte de cromo (cada 1 g de biomassa é capaz de suprir 11,5% da IDR). Este mineral é importante na manutenção do metabolismo da glicose, possivelmente pela potencialização da ação da insulina em nível da membrana celular e assim, influencia o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Casey e Wabravens, 1988; Venezuela, 2001).

Outros pesquisadores que estudaram alguns minerais em biomassas de *Spirulina* comercial encontraram 0,533 a 6,225  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; 0,002 a 0,036  $\mu\text{g g}^{-1}$ ; 0,005 a 2,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  de zinco,

magnésio e manganês, respectivamente (Al-Dhabi, 2013). Ramírez-Moreno e Olvera-Ramírez (2006), que fizeram uma revisão sobre estudos da composição nutricional de *Spirulina* sp. relatam que a biomassa para consumo humano deve conter 1 – 14% de potássio; 0,4 – 0,5% de sódio; 0,3 – 0,7% de potássio; 0,1 – 0,4% de cálcio; 0,1 – 0,2% de magnésio; 0,03 – 0,05% de ferro; 0,005% de manganês; 0,003% de zinco e 0,0012% de cobre.

**Figura 2. Composição (%) de proteínas, cinzas, carboidratos, lipídios e fibra bruta em *Spirulina* sp. LEB-18.**



O gráfico representado pela Figura 2 indica os percentuais de outros nutrientes, como proteínas, cinzas, carboidratos, lipídios e fibra bruta (em base seca) na biomassa *Spirulina* sp. LEB-18. Como esperado para cianobactérias, o teor protéico representa mais do que 50% dos nutrientes. Conforme Habib et al. (2008), a *Spirulina* sp. é uma cianobactéria que tem a seguinte composição química: proteínas (50 – 70%), carboidratos (15 – 25%), lipídios (6 – 8%), cinzas (7 – 13%), fibra (8 – 10%) e umidade (3 – 7%). Madkour et al. (2012) encontraram em *Spirulina platensis* cultivada em diferentes meios de cultura 37,8 a 53% de proteínas; 13,2 a 24,5% de carboidratos e 5,6 a 15,4% de lipídios. Oliveira et al. (2009), que estudaram a influência da secagem em *Spirulina* sp., encontraram na amostra seca 64,1% de proteínas, 10,3% de carboidratos, 8,6% de lipídios e 7,3% de cinzas.

O valor da *Spirulina* sp. é determinado pela variedade de nutrientes que ela contém, dos quais alguns não são sintetizados pelo organismo humano. Apresenta micro e

macronutrientes e devido a esse fato torna-se um alimento completo qualitativamente e, se consumida em doses determinadas, também quantitativamente. Pode-se dizer que a *Spirulina* sp. é um alimento com maior número de elementos nutritivos diferentes por unidade de peso e o organismo necessitaria de 20 g dessa cianobactéria para satisfazer todas as suas necessidades diárias (Phang et al., 2000).

Levando-se em consideração os conteúdos de minerais, proteínas, carboidratos e lipídios presentes na *Spirulina* sp. LEB-18 pode-se observar um resultado interessante desses componentes em uma única fonte nutricional. No trabalho de Moreira et al. (2013), onde ratos desnutridos foram alimentados por 30 dias com dieta acrescida de *Spirulina* sp. LEB-18, foi possível verificar ótimas respostas quanto ao perfil hematológico e bioquímico do sangue, indicando a cianobactéria em estudo como uma excelente suplementação para a alimentação humana.

## **CONCLUSÃO**

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18, cultivado no sul do Brasil, em meio Zarrouk, representa uma opção atrativa para o desenvolvimento de suplementação nutricional em virtude do alto teor protéico e de minerais, em especial o ferro, presente na biomassa celular obtidas no processo.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao suporte financeiro de REDE NANOFOTOBIOTEC/CAPES, CNPq e FAPERGS.

## **REFERENCIAS**

AOAC (2000). Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis, Washington, DC: AOAC (CDROM).

- Al-Dhabi NA (2013). Heavy metals analysis in commercial *Spirulina* products for human consumption. Saudi Journal of Biological Sciences <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.006>
- Belay AOY, Miyakawa K, Shimamatsu H (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. Journal Applied of Phycology, 5:235- 41.
- Belay AOY (1997). Mass culture of *Spirulina* outdoors. – The Earthrise Farms experience. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor and Francis. London. pp. 131-158.
- Bligh EG, Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid. Extraction and purification. Canadian Journal Biochemistry Physiology. 37:911-917.
- Braga EO, Mendonça LG (2010). Discussion of the rational use of human diets, with focus to its main constituents: linseed and quinoa. Perspectivas da Ciência e Tecnologia, 2(1): 32-43.
- Brasil – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). Regulamento técnico sobre ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais. Available from: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8989-1-0%5D.PDF>
- Casey CE, Walravens PA (1988). Nutrition during infancy. Philadelphia: Hanley & Belfus. 126p.
- FDA - Food and Drug Administration. (2011). Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>.
- Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MRA (2008). A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for human and feeds for domestic animals and fish. FAO Fisheries and Aquaculture Circular n° 1034. Rome, FAO. 33p.
- Henrikson R (1994). *Spirulina: food of the future*. 2nd Ed. Barcelona: Urano S.A. pp. 222.
- Madkour FF, Kamil AE, Nasr HS (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. Egyptian Journal of Aquatic Research. 38: 51-77.
- Mafra D, Cozzolino SMF (2004). The importance of zinc in human nutrition. Rev. Nutri. 17(1):79-87.
- Morais MG, Reichert CC, Dalcanton F, Durante AJ, Marins LFF, Costa JAV (2008). Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. Zeitschrift für Naturforsch, 63:144 - 150.

- Morais MG, Radmann EM, Andrade MR, Teixeira GG, Bruschi LRF, Costa JAV (2009). Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brasil. *Aquaculture*, 294:60-64.
- Moreira LM, Rocha ASR, Ribeiro CLG, Rodrigues RS, Souza-Soares LA (2012). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina* platensis. *African Journal of Food Science*, 5(15):799 – 805.
- Moreira LM, Behling B, Rodrigues RS, Costa JAV, Souza-Soares LA (2013). *Spirulina* as a Protein Source in the Nutritional Recovery of Wistar Rats. *Brasilian Archives of Biology and Technology*, 56(3):447 – 456.
- Oliveira EG, Rosa GS, Rosa MA, Pinto LAA (2009). Characterization of thin layer drying of *Spirulina* platensis utilizing perpendicular air flow. *Bioresource Technology*, 100:1297–1303
- Phang SM, Miah MS, Chuu WL, Hashin M (2000). *Spirulina* culture in digested starch factory waste water. *J. Appl. Phycol*, 12: 395-400.
- Predrao DF, Rocha ACD, Queiroz EO, Sousa CPC (2011). Zinc nutritional status in children attending public daycare centers in the state of Paraíba, Brasil. *Rev. Nutr.*, 24(4): 539-552.
- Radmann EM, Costa JAV (2008). Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. *Química Nova*, 31(7): 1609-1612.
- Ramírez-Moreno L, Olvera-Ramírez (2006). Uso actual y tradicional de *Spirulina* sp. *Interciencia – Revista de Ciencia y Tecnología de América*. 31(9): 657-663.
- Sarno F (2010). Estimativas do consumo de sódio no Brasil, revisão dos benefícios relacionados à limitação do consumo deste nutriente na Síndrome Metabólica e avaliação do impacto de intervenção no local de trabalho. Tese de doutorado (Nutrição em Saúde Pública). São Paulo, SP, Brasil.
- Statistica (2004). Statsoft (Data analysis software system), version 7 for Windows.
- TACO (2011). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4ª Edição revisada e ampliada. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 161p.
- Venezuela TC (2001). Determinação de contaminantes metálicos (metal tóxico) num solo adubado com composto de lixo em área olerícola no município de Nova Friburgo. Dissertação de mestrado (Programa de pós-graduação em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 96p.

Zepka LQ, Jacob-Lopes E, Goldbeck R, Souza-Soares, LA, Queiroz, MI (2010). Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanethecemicropica* Nägeli. *Bioresource Technology*. 101: 7107-7111.

## **Artigo II**

## **Obtenção de micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 como fonte alternativa de ferro e outros nutrientes para alimentação humana**

No Brasil, estudos conduzidos em diversos Estados indicam que a anemia ferropriva prevalece em 70% das crianças na faixa etária de 6 a 12 meses de idade, além de gestantes, lactantes e lactentes, e por isso se tornou obrigatória a adição de sais de ferro em farinhas de trigo e de milho. Com o objetivo de oferecer fonte alternativa deste mineral e de outros nutrientes, foram obtidas e caracterizadas micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18. Para obtenção foi utilizada a técnica de ultrahomogeneização, que consiste na homogeneização da biomassa seca (amostra A) com solução tampão fosfato de sódio (amostra B) e água destilada (amostra C) na proporção 1:100 a  $10^3$  rpm por 20 min e analisada quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão e morfologia. Constatado o tamanho das partículas em escala nanométrica, estas foram encaminhadas à determinação da composição proximal, teores de minerais e biodisponibilidade de ferro. Os resultados indicam a viabilidade da técnica de agitação mecânica para obtenção de nanopartículas microalgais, porém essas têm, em grande parte, seu perfil nutricional afetado, quando comparado ao da micropartícula de *Spirulina* sp. LEB-18. A amostra C apresentou quantidade e biodisponibilidade de ferro superiores às demais (A e B) e mais próximas ao recomendado pela FDA e menor teor de sódio, mostrando-se como uma possível fonte alternativa ao combate de carências nutricionais, em especial à anemia ferropriva.

Palavras chaves: cianobactéria, biodisponibilidade, minerais, nanobiotecnologia, nutrição.

### **INTRODUÇÃO**

A fome e a desnutrição ainda são causas de doenças e conseqüentemente da mortalidade de pessoas, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Por outro lado, a população mais favorecida economicamente busca por alimentos nutritivos e com alguma ação benéfica à saúde. Estes motivos estes que tem despertado interesse dos pesquisadores por novas fontes nutricionais, funcionais e de baixo custo (Naves et al., 2010).

A anemia por deficiência de ferro é, isoladamente, a mais frequente das deficiências nutricionais no mundo e ocorre como resultado de perda sanguínea crônica; ingestão e/ou absorção deficiente do mineral e aumento de volume sanguíneo, ocorrendo a diminuição dos níveis plasmáticos de ferro (Carvalho et al., 2006). A fortificação de alimentos com ferro é um método complexo, pois as formas biodisponíveis são quimicamente reativas e produzem, na maioria das vezes, efeitos tecnologicamente indesejáveis quando adicionadas aos alimentos (Marques et al., 2012).

O termo biodisponível, relacionado ao mineral ferro, é a medida da fração do ferro alimentar capaz de ser absorvida pelo trato gastrointestinal e subsequentemente armazenada e incorporada. Em diversas pesquisas o aumento da absorção de ferro foi relatado após a sua redução em micropartículas (Wegmuller et al., 2004; Cocato et al., 2007). Rohner et al. (2007), após reduzirem compostos solúveis de ferro em nanopartículas, verificaram através de experimento com ratos o aumento da biodisponibilidade deste mineral.

A aplicação da nanobiotecnologia em alimentos é recente em comparação com as áreas biomédica e das indústrias de tecnologia de informação. No entanto, existem inúmeras oportunidades que podem ser exploradas na indústria de alimentos, como a elaboração de produtos com características funcionais de saúde, desenvolvimento de processos e embalagens inteligentes e/ou bioativas (Chau et al., 2007; Sahoo et al., 2007). Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 200 nm (Schaffazick et al., 2003).

*Spirulina* sp. é a principal microalga estudada e produzida devido suas propriedades nutricionais e benéficas à saúde. Segundo Cohen (1997), Colla et al. (2008) e Moreira et al. (2013) esta cianobactéria apresenta composição apropriada de proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas e minerais. Segundo a FDA a *Spirulina* é classificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), o que garante seu uso como alimento sem riscos à saúde.

O objetivo deste trabalho foi obter micro e nanopartículas a partir da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 e avaliar, através de ensaios *in vitro*, sua composição nutricional, bem como sua disponibilidade de ferro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção e preparo da matriz**

Para desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a biomassa seca da microalga *Spirulina* sp. LEB-18. Sua produção foi realizada na Planta Piloto localizada as margens da Lagoa Mangueira, no município de Santa Vitória do Palmar, RS (33° 30' 13'' S e 53° 08' 59'' W). A unidade consiste de 3 tanques abertos tipo *Raceway* de 10000 L e 1 tanque aberto tipo *Raceway* de 1000 L para propagação do inóculo. Os cultivos são cobertos por túnel de filme transparente com proteção contra raios UV e expostos a condições ambientais naturais. Quando a microalga atinge a concentração 0,50 g L<sup>-1</sup>, sua biomassa é separada através de filtração e seca em secador de bandejas a 50 °C por 5 h (Morais et al., 2008). A biomassa obtida foi triturada em moinho de bolas (Quimis®) e peneirada em agitador de peneiras eletromagnético (Quimis®) até alcançar granulometria máxima de 88 µm (Tyler 170) (Cremasco, 2012), denominando-a “Amostra A”.

### **Obtenção das nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18**

As nanopartículas foram obtidas através da técnica de agitação mecânica (Anton et al., 2008) sendo que a escolha do solvente, rotação e tempo se deu conforme as condições otimizadas no estudo de Dotto (2012). Inicialmente, a amostra A foi misturada com solvente, na proporção 1:100 (p/v), e agitada a 10<sup>3</sup> rpm por 20 min em Homogeneizador Digital Ultraturrax (Dremel, 1100-01, Brasil). Os solventes escolhidos para obtenção das nanopartículas denominadas de B e C, respectivamente, foram: solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> com pH 7 e água destilada (pH 6,9). Após ultrahomogeneização as suspensões foram encaminhadas ao banho ultrassônico (60 Hz, 20°C, 25 min) e, para fins de padronização de tamanho e eliminação de impurezas, filtradas em sistema a vácuo, utilizando-se filtros de membranas de éster de celulose 0,45 µm (Merck Millipore®).

### **Determinação do diâmetro médio e índice de polidispersão das nanopartículas**

As suspensões filtradas das amostras B e C tiveram seus diâmetros e índices de polidispersão avaliados em até 48 h após o processo de obtenção das nanopartículas

através da técnica do espalhamento dinâmico de luz em equipamento modelo EMI 9863 (Brookhaven Instrument®). Previamente às determinações, as suspensões foram dissolvidas em seus respectivos solventes (solução tampão fosfato pH 7,0; 0,2 mol L<sup>-1</sup> para a amostra B, e água destilada para a amostra C), sendo estas proporções estabelecidas com base em testes anteriores, levando-se em consideração a turbidez da solução final e reprodutibilidade do método.

### **Morfologia das micro e das nanopartículas**

Para análise morfológica as suspensões das partículas B e C foram previamente congeladas a -80 °C por 48 h e desidratadas por sublimação em liofilizador de bancada modelo FD 5505, utilizando temperatura de -45 °C. Após, amostras de *Spirulina* sp. LEB-18 em tamanho micrométrico (A) e nanométrico (B e C) foram tratadas com acetona em banho ultrassônico por 25 min, metalizadas em ouro por 3 min e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL, JSM, JAPÃO) nas resoluções de 300 e 1.000 vezes e voltagem de 10 kV.

### **Determinação da composição proximal**

As amostras A, B e C tiveram seus teores de umidade, cinzas e proteínas determinados conforme AOAC (2000). O teor de lipídios foi obtido pelo método de Bligh e Dyer (1959).

### **Determinação de minerais**

As amostras A, B e C foram pesadas (~300 mg) em triplicata e feita a digestão em forno de micro-ondas modelo Speedwave Four (Berghof, Alemanha). Para a digestão, foram usados 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e bidestilado (Merck) e 0,5 mL de HF 40% (Merck). O programa de aquecimento do forno de micro-ondas ocorreu em 3 etapas, conforme descrição na Tabela 1.

**Tabela 1. Programa de aquecimento do forno de micro-ondas**

Etapas	Rampa (min)	T (°C)	Tempo de permanência (min)	Pressão (bar)
1	20	170	10	35
2	5	200	25	35
3	5	50	20	35

Após a digestão, as amostras foram diluídas entre 5 e 500 vezes em HNO<sub>3</sub> 5% (p/v), para posterior quantificação. As determinações foram feitas em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado Perkin Elmer (modelo Optima 4300 DV, Shelton, USA), com vista axial através das seguintes condições operacionais: 1400 W; vazão do gás principal de 15 L min<sup>-1</sup>; vazão do gás auxiliar de 0,2 L min<sup>-1</sup>; vazão do gás de nebulização 0,7 L min<sup>-1</sup> e comprimento de onda conforme o mineral avaliado.

#### **Determinação da biodisponibilidade de ferro *in vitro***

A biodisponibilidade de ferro foi determinada nas amostras A, B e C conforme método proposto por Lutten et al. (1996). Nesta análise cada amostra sofreu digestão com HCl-pepsina e solução pancreatina-bile e após realizou-se leitura em espectrofotômetro a 533 nm. A quantidade de ferro dialisável foi obtida através de curva padrão com cloreto de ferro.

#### **Tratamento estatístico**

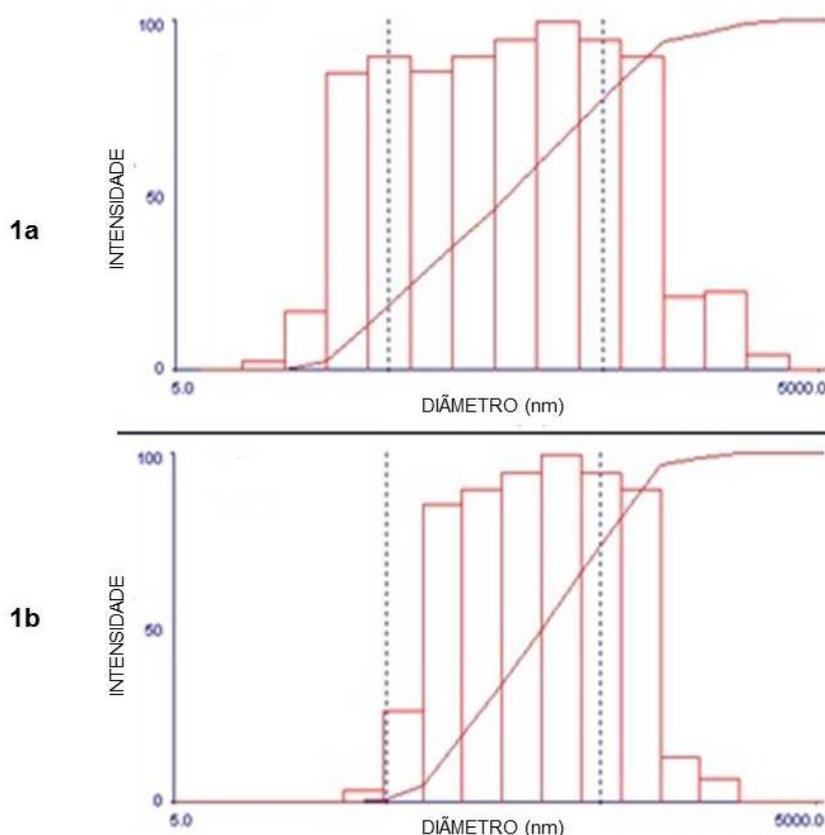
Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e morfologia

A Figura 1 corresponde aos histogramas referentes à distribuição de tamanho das partículas nanométricas de *Spirulina* sp. LEB-18 B (1a) e C (1b) pelo método de espalhamento dinâmico de luz. O diâmetro médio das partículas micrométricas de *Spirulina* seca (A) foi ajustado somente através do ensaio de peneiras, utilizando Tyler 170 para obtenção de partículas com diâmetro inferior a 88  $\mu\text{m}$ .

Figura 1. Gráficos de distribuição de tamanho das nanopartículas B (1a) e C (1b)



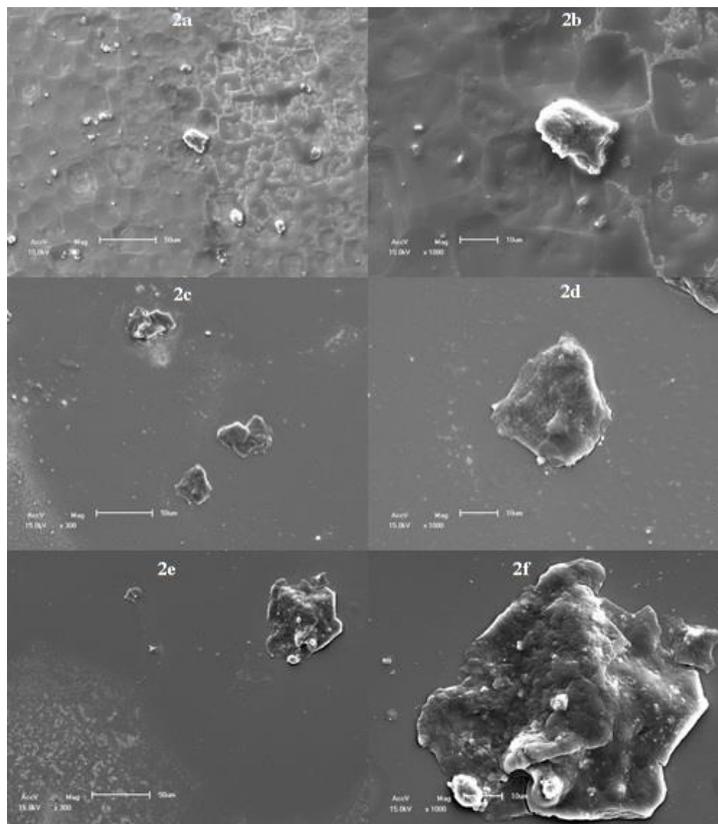
Os tamanhos médios para as amostras B (preparada com solução tampão fosfato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 7) e C (preparada com água destilada) foram, respectivamente,  $153,5^b \pm 6,65$  e  $206,5^a \pm 2,98^a$  nm. No estudo de Dotto et al. (2012) foram encontradas nanopartículas microalgais, obtidas com solução tampão fosfato ácido cítrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e diferentes valores de pH, em torno de 210 nm (120 a 350 nm).

Machado (2012), que elaborou nanopartículas de *Spirulina* sp. com solução tampão fosfato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 7, encontrou um tamanho médio de 215 nm. Comparando os valores obtidos para os diâmetros médios das duas partículas nanométricas (B e C) observa-se que ambas as partículas se encontram nas faixas de tamanho estabelecidas para nanomateriais por diversos pesquisadores (Sanguansri e Augustin, 2006; Chau et al., 2007; Sahoo et al., 2007).

Através da mesma técnica os índices de polidispersão (IP) das nanopartículas também foram estudados. As amostras B e C apresentam IP de 0,491 e 0,510, respectivamente. O índice de polidispersão, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, foi alto ( $> 0,3$ ) para todas as amostras, indicando a formação de sistemas com uma faixa variada de tamanho das partículas (Nemen e Lemos-Senna, 2011). Dotto et al. (2012), que estudaram nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-52 através da técnica de ultrahomogeneização, encontraram um valor de IP em torno de 0,150, indicando variação pequena de tamanho entre as partículas da amostra.

Machado (2012), que trabalhou com as mesmas condições experimentais do presente trabalho, obteve nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 com IP igual a 0,432, valor bem próximo dos obtidos para as partículas B e C. A polidispersividade reflete uma variância da distribuição de tamanhos causada por algum fator, sendo o mais provável a natureza e/ou concentração da matéria-prima (Santos e Barboza, 2013). Além disso, segundo Fan et al. (2012) o método de ultrahomogeneização pode ocasionar a destruição das forças repulsivas entre as nanopartículas levando à sua agregação. Para conhecimento da estrutura morfológica das partículas desenvolvidas (A, B, C) foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 2).

**Figura 2. Microfotografias eletrônicas das amostras microalgais em tamanhos micro (A) e nanométrico (B e C) .**



Legenda: nanopartícula de *Spirulina* sp. LEB-18 preparada com água destilada (amostra C) visualizada em MEV sob aumento de 300 (2a) e 1000 (2b) vezes; nanopartícula de *Spirulina* sp. LEB-18 preparada com solução tampão fosfato de sódio (amostra B) visualizada em MEV sob aumento de 300 (2c) e 1000 (2d) vezes; micropartícula de *Spirulina* sp. LEB-18 (amostra A) visualizada em MEV sob aumento de 300 (2e) e 1000 (2f) vezes.

Nas microfotografias é possível observar que as três amostras analisadas apresentam morfologia irregular e que, na maioria das vezes, são formadas por aglomerações de partículas. A liofilização consiste na remoção da água (gelo) através de sublimação e tem sido amplamente empregada para a secagem de suspensões de nanopartículas, entretanto através da técnica de microscopia eletrônica de varredura verifica-se que o método de secagem proporciona a formação de grumos e, conseqüentemente, aumento do tamanho da partícula (Schaffazick et al., 2003).

### **Composição proximal, perfil de minerais e biodisponibilidade de ferro**

As respostas obtidas nas determinações de macro e micronutrientes e na biodisponibilidade *in vitro* de ferro nas partículas estudadas encontram-se na Tabela 2. Comparando-se a composição proximal entre as amostras A, B e C, onde as nanopartículas obtidas foram preparadas através da ultrahomogeneização com solução tampão ou com água destilada, verifica-se que as amostras B e C apresentam teores de umidade, proteínas e lipídios inferiores ( $p < 0,05$ ) ao da biomassa microalgal (amostra A). Além disso, é visível o expressivo aumento do teor de cinzas na amostra B, o qual pode ser explicado pela adição do tampão fosfato de sódio no seu processo de obtenção.

Observa-se ainda em relação a esta amostra que a mesma apresenta valores de umidade, proteínas e lipídios baixos e de cinzas alto quando comparados aos dados recomendados para *Spirulina* sp. pela FDA. A amostra C, preparada através da homogeneização da biomassa microalgal com água destilada, com exceção do teor de umidade, apresentou respostas mais próximas às citadas pela literatura (FDA, 2014).

Quanto aos teores de minerais é possível verificar, quando comparados aos presentes na biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18, que durante o processo de obtenção das nanopartículas com solução tampão ou com água ocorrem perdas destes nutrientes, com exceção do cromo, o qual é expressivamente maior ( $p < 0,05$ ) do que o da biomassa seca. Ao confrontarmos os valores de minerais das amostras B e C verifica-se que o sódio e o fósforo foram encontrados em maior percentual ( $p < 0,05$ ) na amostra obtida através da homogeneização da biomassa com solução tampão fosfato de sódio, fato já esperado, uma vez que houve a adição destes minerais através do tampão utilizado.

Comparando os percentuais de minerais da amostra B com os valores recomendados pela FDA (2014) verifica-se que as nanopartículas apresentam valores de sódio, cálcio, fósforo e manganês mais elevados, com destaque para os níveis de sódio (10 vezes mais) e fósforo (13 vezes mais). Já os teores de potássio, magnésio, ferro, zinco e cobre encontrados foram inferiores ao da literatura (FDA, 2014). Os teores de enxofre e cromo, não referenciados pela FDA, foram comparados com os dados obtidos para a biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18, verificando-se que o teor de enxofre é inferior, enquanto que cromo é maior ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2 – Conteúdo de macronutrientes (%), minerais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e biodisponibilidade *in vitro* de ferro (%) das partículas micro (A) e nanométricas (B, C) de *Spirulina* sp. LEB-18 em comparação com valores recomendados pela FDA**

	A	B	C	FDA <sup>1</sup>
<i>Macronutrientes (% <math>\pm</math> dp)</i>				
Umidade	14 <sup>a</sup> $\pm$ 0,6	1,5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,3	2 <sup>b</sup> $\pm$ 0,2	3 – 6
Proteínas <sup>2</sup>	58,5 <sup>a</sup> $\pm$ 2,4	19,5 <sup>c</sup> $\pm$ 3,9	36 <sup>b</sup> $\pm$ 1,3	53 – 62
Lipídios <sup>2</sup>	7 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	3,5 <sup>c</sup> $\pm$ 0,8	5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,2	4 – 6
Cinzas <sup>2</sup>	12 <sup>c</sup> $\pm$ 0,9	52 <sup>a</sup> $\pm$ 2,2	13,5 <sup>b</sup> $\pm$ 0,4	8 – 13
<i>Minerais (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math> <math>\pm</math> dp)</i>				
Na	19486 <sup>a</sup> $\pm$ 99	146552 <sup>b</sup> $\pm$ 485	2763 <sup>c</sup> $\pm$ 132	14000
Ca	15108 <sup>a</sup> $\pm$ 529	7198 <sup>b</sup> $\pm$ 50	7502 <sup>b</sup> $\pm$ 29	4667
K	14036 <sup>a</sup> $\pm$ 109	897 <sup>c</sup> $\pm$ 584	1933 <sup>b</sup> $\pm$ 85	18667
P	8736 <sup>b</sup> $\pm$ 19	136369 <sup>a</sup> $\pm$ 1441	5520 <sup>c</sup> $\pm$ 545	10000
Mg	4722 <sup>a</sup> $\pm$ 83	2066 <sup>c</sup> $\pm$ 40	3947 <sup>b</sup> $\pm$ 234	7667
S	6764 <sup>a</sup> $\pm$ 323	2859 <sup>c</sup> $\pm$ 50	5067 <sup>b</sup> $\pm$ 47	-
Fe	956 <sup>a</sup> $\pm$ 9	479 <sup>c</sup> $\pm$ 12	759 <sup>b</sup> $\pm$ 74	533
Mn	106 <sup>a</sup> $\pm$ 2	49,2 <sup>c</sup> $\pm$ 0,6	72,552 <sup>b</sup> $\pm$ 3,8	32
Zn	35,4 <sup>a</sup> $\pm$ 0,8	16,7 <sup>b</sup> $\pm$ 0,9	38,2 <sup>a</sup> $\pm$ 4,1	27
Cu	11,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	3,69 <sup>c</sup> $\pm$ 0,25	6,82 <sup>b</sup> $\pm$ 0,27	7
Cr	4,07 <sup>b</sup> $\pm$ 0,2	22,9 <sup>a</sup> $\pm$ 0,2	22,0 <sup>a</sup> $\pm$ 1,1	-
<i>Biodisponibilidade de ferro (%<math>\pm</math> dp)</i>				
-	21,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,56	15,32 <sup>b</sup> $\pm$ 1,20	20,14 <sup>a</sup> $\pm$ 1,00	-

<sup>1</sup>Food and Drug Administration (2014); <sup>2</sup>Valores em base seca. Média de 3 repetições  $\pm$  desvio padrão (dp). Letras distintas na mesma linha, entre as amostras A, B e C, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à amostra C, observa-se que os macrominerais sódio, potássio, fósforo e magnésio apresentam um percentual abaixo do preconizado pela FDA (2014); enquanto que os microelementos se encontram em quantidade mais elevada (ferro, manganês e zinco) ou muito próxima (cobre) à preconizada pela FDA (2014). Quanto às respostas obtidas na determinação de enxofre e cromo essas são semelhantes às encontradas na amostra B; o teor

de enxofre é inferior, enquanto que cromo está acima do citado pela literatura (Moreira et al., 2013). A vantagem da utilização de água destilada na obtenção destas nanopartículas está, principalmente, no reduzido teor de sódio, uma vez que ele é atualmente alvo de estudos e revisões comportamentais (Nilson et al., 2012).

Independente do mineral, seja ele micro ou macroelemento, todos os determinados neste trabalho são essenciais às diversas funções biológicas do organismo humano. Além disso, pesquisas têm demonstrado a associação do consumo de alguns deles ao tratamento de algumas enfermidades. Destaca-se, entre o macrominerais, o cálcio no combate à osteoporose, câncer de colón, hipertensão arterial e obesidade. E o zinco, micronineral associado ao controle de doenças degenerativas através de seu caráter antioxidante (Mafra e Cozzolino, 2004; Pedraza et al., 2011).

O ferro, apesar de ser um nutriente essencial presente em diversos alimentos, está ligado à anemia ferropriva que é a carência nutricional mais prevalente em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Presente principalmente em alimentos de origem animal (ligado à hemoglobina das carnes vermelhas), também ocorre em alguns vegetais, como germe de trigo, salsa, cenoura, couve, repolho, espinafre, aveia, arroz e leguminosas em geral. A concentração de ferro encontrada em cereais e em grãos não difere muito, sendo que a faixa de concentração é de 25 a 80  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Se forem tomados como referência alimentos conhecidos mundialmente como fonte de ferro, tais como fígado cru (56  $\mu\text{g g}^{-1}$ ); feijão rajado cru (18  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e açúcar mascavo (8,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Taco, 2011), a *Spirulina* sp. LEB-18 (956  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e suas nanopartículas C (759  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e B (479  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) apresentam-se como fontes bem mais representativas deste mineral.

Em relação à biodisponibilidade *in vitro* do ferro, a amostra C apresentou resultado superior ( $p < 0,5$ ) à B e não diferiu da biomassa microalgal de *Spirulina* sp. LEB-18. Os resultados para biodisponibilidade corroboram com aqueles tradicionalmente relevantes em ferro como feijão carioca cru e carne bovina os quais têm 17 e 24%, respectivamente, de ferro biodisponível (Moura e Canniatti-Brazaca, 2006).

## CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível verificar que a técnica de agitação mecânica é viável para obtenção de nanopartículas microalgais, porém essas têm, em grande parte, seu perfil nutricional afetado negativamente, quando comparado ao da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18. Apesar de haver diminuição no percentual da maioria dos nutrientes nas nanopartículas B (biomassa homogeneizada com solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0) e C (biomassa homogeneizada com água destilada pH 6,9), esta última apresentou quantidade e biodisponibilidade de ferro superiores à amostra B e mais próximos ao da biomassa seca e ao recomendado pela FDA, além do menor teor de sódio, sendo uma possível fonte alternativa de nutrientes para a alimentação humana.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo n° 472562/2012-6) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Protocolo n° 2485.271.13638.27022013) pelo apoio financeiro à execução deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis**, 17ª Edição, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, 911-917p., 1959.
- CARVALHO, M. C.; BARACAT, E. C. E.; SGARBIERI, V. C. Anemia ferropriva e anemia de doença crônica: distúrbios do metabolismo de ferro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, 54-63p., 2006.
- CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, 269-280p., 2007.

- COCATO, M. L.; RÊ, M. I.; NETO, M. A. T.; CHIEBAO, H. P.; COLLI, C. Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 3, 239-247p., 2007.
- COHEN, Z. **The chemicals of *Spirulina***. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 233 p., 1997.
- COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Arquivo Brasileiro de Biologia e Tecnologia**, v. 51, n. 2, 405-411p., 2008.
- CREMASCO, M. A. **Operações unitárias em sistemas particulados e fluidomecânicos**. São Paulo: Blucher, 2012.
- DOTTO, G. L.; LIMA, E. C.; PINTO, L. A. A. Biosorption of food dyes onto *Spirulina platensis* nanoparticles: Equilibrium isotherm and thermodynamic analysis, **Bioresource Technology**, v.103, 123-130p., 2012.
- FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of modisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, 21-27p., 2012.
- FDA - **Food and Drug Administration**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: junho de 2014.
- LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A. Interlaboratory trial of the determination of the *in vitro* iron dialysability from food. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 72, n. 4, p. 415-424, 1996.
- MACHADO, A. R. **Avaliação biológica de *Spirulina* em tamanhos micro e nanométrico e estudo da sua encapsulação em lipossomas**. Rio Grande, 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande.
- MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. The importance of zinc in human nutrition. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, 79-87p., 2004.
- MARQUES, M. F.; MARQUES, M, M.; XAVIER, E. R.; GREGÓRIO, E. L. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. **Revista do Hospital Universitário de Juiz de Fora**, v. 38, n. 1, 2012.

- MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação da biodisponibilidade de ferro de feijão comum em comparação com carne bovina. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 2, p. 270-276, 2006.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A .V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Z. Naturforsch.** v. 63, 144–150p., 2008.
- MOREIRA, L. M.; BEHLING, B. S.; RODRIGUES, R. S.; COSTA, J. A. V.; SOUZA-SOARES, L. A. de. *Spirulina* as a Protein Source in the Nutritional recovery of Wistar Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, n.3, 447-456p., 2013.
- NAVES, L. P.; CORREA, A. D.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P. Antinutritional components and protein digestibility in pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*) submitted to different processing methods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, 180-184p., 2010.
- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v.34, 408-413p., 2011.
- NILSON, E. A.; JAIME, P. C.; RESENDE, D. O. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para a redução do teor de sódio em alimentos processados. **Revista Panamericana de Salud Publica**. V. 34, n. 4, p. 287–92, 2012.
- PREDRAZO, D. F.; ROCHA, A.C.D.; QUEIROZ, E.O.; SOUSA, C.P.C. Zinc nutritional status in children attending public daycare centers in the state of Paraíba, Brasil. **Revista de Nutrição**, v. 24, n.4, 539-552p., 2011.
- ROHNER, F.; ERNEST, F. O.; ARNOLD, M.; HILBE, M.; BIEBINGER, R.; EHRENSPERGER, F.; PRATSINIS, S. E.; LANGHANS, W.; HURRELL, R. F.; ZIMMERMANN, M. B. Synthesis, characterization and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles. **Nutrient physiology, metabolism and nutrient interactions**, v. 137, 614-619p., 2007.
- SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, 20-31p., 2007.
- SANGUANSRI; AUGUSTIN. Nanoscale materials development-a food industry perspective. **Food Science and Technology**, v. 17, 547-556p., 2006.

- SANTOS, E. P.; BARBOZA, J. C. S. Avaliação do Uso de Amidos Aniônicos Hidrolisados como Estabilizantes em Nanocápsulas Poliméricas para Formulações Tópicas. **Polímeros**, v. 23, n.5, 624-629p., 2013.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, 726-737p., 2003.
- TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ª Edição revisada e ampliada. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 161p., 2011.
- WEGMULLER, R.; ZIMMERMANN, M. B.; MORETTI, D.; ARNOLD, M.; LANGHANS, W.; HURREL, R. Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. **Nutrient metabolism**, v. 134, 3301-3304p., 2004.

**Artigo III**

## Micro e nanopartículas de biomassa microalgal: estudo citotóxico em células de fígado de Zebrafish (*Danio rerio*)

*Spirulina* sp. é uma cianobactéria conhecida mundialmente devido às suas propriedades nutricionais e benéficas à saúde. Através da aplicação da nanobiotecnologia à biomassa microalgal de *Spirulina* sp. LEB-18 os autores desta pesquisa têm buscado por uma fonte alternativa de nutrientes para a alimentação humana. Para isso, este trabalho tem como principal objetivo verificar a existência ou não de toxicidade através de teste *in vitro* de micro e nanopartículas de *Spirulina* sp. Após obtenção e determinação dos diâmetros das partículas, denominadas de A (88 µm), B (153,5 nm) e C (206,5 nm), a viabilidade de células de fígado de *Zebrafish* foi medida pelo método de MTT (3-(4,5--2-yl)-2,5-ditetrazolium bromide). As células foram incubadas a 28 °C por 0, 24, 48 e 72 h sob diferentes tratamentos: Controle (CT), onde as células não receberam amostra; *Spirulina* micrométrica (A), *Spirulina* nanométrica preparada com solução tampão fosfato de sódio (B) e *Spirulina* nanométrica preparada com água destilada (C), as três nas concentrações 1, 10, 100 e 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Após cada tempo de incubação os valores de absorbância foram determinados a 490 nm em um leitor de placas. As nanopartículas B e C tiveram efeitos variados sobre as células de *Zebrafish* nas diferentes concentrações e tempos analisados, sendo que a nanopartícula C, preparada a partir da ultrahomogeneização da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 com água destilada apresentou menor variação dos resultados e somente em uma condição (1000 µg mL/24 h) causou inibição celular, quando comparada ao tratamento controle, sendo essa considerada pelos autores como uma potencial fonte alternativa de nutrientes para alimentação humana.

Palavras-chave: biocompatibilidade, cianobactéria, nanobiotecnologia, *Spirulina*.

### INTRODUÇÃO

*Spirulina* sp. é uma cianobactéria filamentosa que forma tricomas cilíndricos multicelulares com 1 a 12 µm de diâmetro e se dispõem em forma espiralada. Através da fotossíntese essa microalga converte os nutrientes do meio em material celular, liberando oxigênio (Moreira et al., 2013). Esse micro-organismo é estudado há muitos anos, tendo uma

longa e documentada história de consumo humano nas Américas do Norte e do Sul, Ásia, Europa, Austrália e África devido às suas propriedades nutricionais e benéficas à saúde.

Em 2003 a *Spirulina* sp. foi aprovada como um alimento para consumo humano por muitos governos, bem como pelas agências de saúde e associações de mais de 70 países, dentre eles Argentina, Estados Unidos, Austrália, Índia e China. Através da comprovação da inocuidade da *Spirulina* sp. por diversas pesquisas realizadas por *Cyanotech Corporation* (Havaí) e *Earthrise Nutritionals* (Califórnia) a FDA (*Food and Drug Administration*) esta microalga foi certificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (FDA, 2014). No Brasil, em maio de 2009, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) incluiu a *Spirulina* sp. na lista de Novos Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos (Brasil, 2009).

A aplicação da nanobiotecnologia em alimentos é recente em comparação com a área biomédica e com as indústrias de tecnologia de informação, em que essa ciência já é bastante utilizada na fabricação de nanomateriais. No entanto, existem inúmeras oportunidades que podem ser exploradas na indústria de alimentos, como a elaboração de produtos com características funcionais, desenvolvimento de processos e embalagens inteligentes e/ou bioativas (Chau et al., 2007; Sahoo et al., 2007). Geralmente as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 200 nm. De acordo com Sanguansri e Augustin (2006), a nanobiotecnologia trabalha com materiais de produção, aplicação e processamento de tamanhos menores que 1000 nm.

A segurança de nanoalimentos tem despertado a atenção em razão do aumento de seu uso; apesar da comercialização rápida da nanobiotecnologia há poucos regulamentos de nanomateriais específicos (Blasco e Picó, 2011). Cabe salientar que nanomateriais podem causar efeito tóxico ao organismo humano, entrando neste, provavelmente, via pulmões e intestinos, sendo que as chances de penetração dependem do tamanho e das propriedades de superfície das partículas e também do ponto de contato no pulmão ou nos intestinos (Sozer e Kokini, 2009; Assis et al., 2012).

Oportunidades de desenvolvimento da nanotecnologia se tornam todos os dias mais vastas e representam um grande potencial de inovação tecnológica, entretanto ainda não estão claros quais os riscos advindos desses produtos aos seres vivos (Shatkin, 2008). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a citotoxicidade de nanopartícula microalgal obtida de biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matriz

Para desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a biomassa seca da microalga *Spirulina* sp. LEB-18. Sua produção é realizada na Planta Piloto localizada as margens da Lagoa Mangueira, no município de Santa Vitória do Palmar, RS (33° 30' 13'' S e 53° 08' 59'' W). A unidade consiste de 3 tanques abertos tipo *Raceway* de 10.000 L e 1 tanque aberto tipo *Raceway* de 1.000 L para propagação do inóculo. Os cultivos são cobertos por túnel de filme transparente com proteção contra raios UV e expostos a condições ambientais naturais. Quando a microalga atinge a concentração 0,50 g L<sup>-1</sup>, sua biomassa é separada através de filtração e seca em secador de bandejas a 50 °C por 5 h (Morais et al., 2008). A biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 foi triturada em moinho de bolas (Quimis®) e peneirada em agitador de peneiras eletromagnético (Quimis®) até alcançar granulometria máxima de 88 µm (Cremasco, 2012), sendo essa denominada de amostra A.

### Preparo e determinação das nanopartículas microalgais

Para obtenção das nanopartículas, 1 g da amostra A foi misturado com 100 mL de solvente (solução tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> com pH 7 ou água destilada pH 6,9) e as soluções agitadas a 10<sup>3</sup> rpm por 20 min em Homogeneizador Digital Ultraturrax (DREMEL, 1100-01, BRASIL) e posteriormente encaminhadas ao banho ultrassônico (60 Hz por 25 min) (Dotto et al., 2012). As nanopartículas obtidas com tampão fosfato de sódio e água destilada, respectivamente, foram denominadas de B e C. Para fins de padronização de tamanho, as suspensões B e C foram filtradas em sistema a vácuo utilizando-se filtros membranas de éster de celulose 0,45 µm (Merck Millipore®). Posteriormente, os diâmetros das partículas B e C foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico em equipamento modelo EMI 9863 (Brookhaven Instrument®).

### **Avaliação da citotoxicidade das micro e nanopartículas**

Para análise citotóxica as amostras foram previamente congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 h, liofilizadas em liofilizador de bancada modelo FD 5505, utilizando temperatura de  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Manutenção celular**

As células de fígado de Zebrafish (*Danio rerio*), da linhagem ZFL foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com bicarbonato de sódio ( $0,2\text{ g L}^{-1}$ ), L-glutamina ( $0,3\text{ g L}^{-1}$ ), Hepes ( $3\text{ g L}^{-1}$ ), 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de antibiótico e antimicótico em garrafas de cultura a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Trindade et al., 1999).

### **Tratamento das células**

As células da linhagem ZFL foram centrifugadas, suspensas em meio RPMI ( $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) e incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h para aderência em placas de cultura de 96 poços. Após a adesão, verificada através de microscopia óptica, as células foram tratadas com soluções das amostras (A, B, C) em água ultrapura em diferentes concentrações (1, 10, 100 e  $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Após tratadas, as células foram incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por até 72 h (Trindade et al., 1999).

### **Viabilidade Celular**

A viabilidade das células ZFL expostas às amostras foi medida pelo método de MTT (3-(4,5-dimetil-2-yl)-2,5-ditetrazolium bromide) imediatamente (0 h), 24 h, 48 h e 72 h, após a incubação a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de acordo com Trindade et al. (1999). Brevemente, após incubação as células foram lavadas com PBS (solução tampão fosfato de sódio) e em seguida foram adicionados  $200\text{ }\mu\text{L}$  de meio RPMI, e  $20\text{ }\mu\text{L}$  de MTT ( $5\text{ mg mL}^{-1}$ ) em cada poço. As placas foram incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 h. Após, o meio foi removido e os cristais de formazan dissolvidos em  $200\text{ }\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Os valores de absorbância foram determinados a  $490\text{ nm}$  em leitor de placas Elisa (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK).

### **Tratamento estatístico**

Os resultados obtidos para o diâmetro das partículas foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, empregando-se o software *Statistica 7.0*. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

O conjunto de dados de ensaio de MTT foi analisado utilizando ANOVA *three-way* seguido por teste de Tukey para comparações múltiplas. Os fatores considerados foram: a amostra utilizada, a concentração da amostra e o período de exposição. A significância foi considerada  $p < 0,05$  em todas as análises. Os dados estão expressos como médias  $\pm$  desvio padrão.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Caracterização do tamanho das nanopartículas**

Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico obtiveram-se respostas distintas ( $p < 0,5$ ) para os tamanhos médios. Os valores foram, respectivamente, para as partículas B e C:  $153,5^b \pm 6,65$  nm e  $206,5^a \pm 2,98$  nm. Segundo Dotto et al. (2012) foram encontradas micropartículas de *Spirulina* sp. LEB-52 com diâmetro variando entre 68 e 75  $\mu$ m e nanopartículas microalgais, obtidas com solução tampão fosfato ácido cítrico  $0,1$  mol L<sup>-1</sup> e diferentes valores de pH, em torno de 210 nm (120 - 350 nm). Machado (2012), que elaborou nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 com solução tampão fosfato de sódio  $0,2$  mol L<sup>-1</sup> e pH 7, encontrou um tamanho médio de 215 nm.

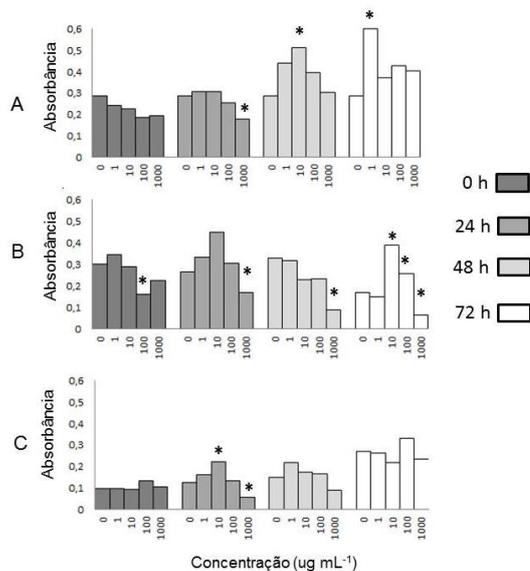
Comparando os valores obtidos para os tamanhos médios das duas partículas nanométricas (B e C) observa-se que a amostra B é significativamente menor. Entretanto, as duas amostras se encontram nas faixas de tamanho estabelecidas para nanomateriais por diversos pesquisadores (Sanguansri e Augustin, 2006; Chau et al., 2007; Sahoo et al., 2007).

### Avaliação da citotoxicidade das micro e nanopartículas

Em relação ao tratamento A pode-se verificar que na condição  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  por 24 h de exposição houve uma diminuição ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular, mas não permaneceu constante nos demais tempos (Figura 1). Além disso, em relação a esse tratamento, nos tempos 48 h ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 72 h ( $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) houve um aumento na absorbância ( $p < 0,05$ ), ou seja, um maior proliferação celular quando comparado ao grupo controle.

As células em contato com a amostra B (nas condições  $100 \mu\text{g mL}^{-1}/0 \text{ h}$ ;  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}/24 \text{ h}$ ;  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}/48 \text{ h}$  e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}/72 \text{ h}$ ) resultaram em menor valor de absorbância, ou seja, menor viabilidade ( $p < 0,5$ ), indicando uma possível toxicidade da nanopartícula preparada a partir da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 com solução tampão fosfato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 7,0; principalmente em relação à concentração de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ainda, nas condições  $10 \mu\text{g mL}^{-1}/24 \text{ h}$ ;  $10 \mu\text{g mL}^{-1}/72 \text{ h}$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}/72 \text{ h}$  verifica-se que houve um crescimento celular maior do que no tratamento controle ( $p < 0,05$ ).

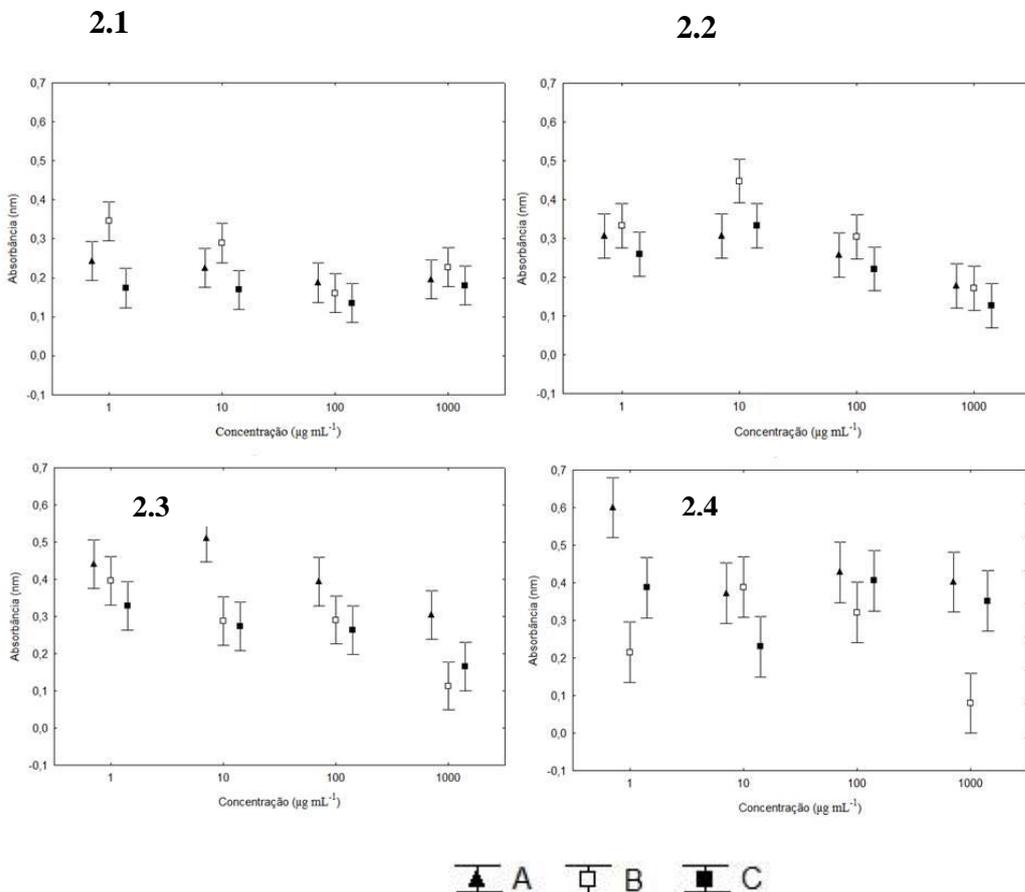
**Figura 1 – Densidade óptica de células de *Zebrafish* expostas a diferentes concentrações (1, 10, 100 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos tratamentos A, B, C nos tempos de exposição tempos 0, 24, 48 e 72 h em comparação com o tratamento controle (somente células – sem adição de amostra)**



A - viabilidade de células expostas à biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 nas concentrações 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e tratamento controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nos tempos 0, 24, 48, 72 h; B - viabilidade de células expostas à nanopartícula preparada com *Spirulina* sp. LEB-18 e tampão fosfato de sódio nas concentrações 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e tratamento controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nos tempos 0, 24, 48, 72 h; C - viabilidade de células expostas à nanopartícula preparada com *Spirulina* sp. LEB-18 e água destilada nas concentrações 1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e tratamento controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) nos tempos 0, 24, 48, 72 h; \*indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o respectivo tratamento em cada tempo de exposição.

A Figura 2 apresenta gráficos que comparam a viabilidade celular entre os três tratamentos (A, B e C) com a finalidade de verificar se existe diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles.

**Figura 2 – Viabilidade de células de *Zebrafish* expostas a diferentes concentrações (1, 10, 100 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dos tratamentos A, B, C nos tempos de exposição tempos 0 (Fig. 2.1), 24 (Fig. 2.2), 48 (Fig. 2.3), e 72 h (Fig. 2.4),**



Conforme as Figuras 2.1 e 2.2, tempos de exposição de 0 e 24 h, respectivamente, os tratamentos A, B e C, independente da concentração analisada, não apresentaram diferença significativa. Na Figura 2.3, que representa o tempo de exposição igual a 48 h verifica-se que as células expostas à amostra micrométrica (A) apresentam valores maiores ( $p < 0,5$ ) de viabilidade celular nas concentrações 10 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Durante o período de 72 h as células expostas a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da amostra micrométrica (A) apresentam maior viabilidade ( $p < 0,5$ ), quando comparadas àquelas que foram incubadas com as amostras nanométricas (B e C) na mesma concentração e tempo, e, as células expostas à 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  da amostra B tiveram sua viabilidade diminuída ( $p < 0,05$ ) neste mesmo tempo de exposição (Fig. 2.4).

Quando as nanopartículas alcançam as células, estas podem ser absorvidas através da membrana celular por diversos processos, como a endocitose, que consiste na invaginação da parede celular sobre a partícula até englobá-la totalmente. Ou ainda por algum outro processo não elucidado totalmente, mas que se trata de um mecanismo semelhante ao utilizado por vírus de dimensões nanométricas para adentrarem nas células (Chen et al., 2005; Yehia et al., 2007). Dentro da célula, as nanopartículas podem gerar espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxila (-OH), provocando o chamado estresse oxidativo de algumas organelas celulares, o qual gera um desequilíbrio redox que supera a defesa antioxidante da célula, causando uma grave disfunção celular (Paschoalino et al., 2010).

Diversos ensaios toxicológicos padronizados estão disponíveis para avaliar a resposta biológica de substâncias, sejam eles realizados em culturas de células (*in vitro*) ou com organismos vivos, como peixes e mamíferos (*in vivo*). Entretanto, não há padronização para a avaliação da toxicidade de partículas em tamanho nanométrico, o que dificulta a comparação de resultados e o consenso sobre a toxicidade de um material. Os estudos realizados até o momento são adaptações dos procedimentos padrões utilizados para outras substâncias (Nanoscience, 2014).

Assim como o presente trabalho, as pesquisas de Auffan et al. (2006) e de Yehia et al. (2007) também não observaram efeito tóxico de nanopartículas através da realização de ensaio *in vitro*. No primeiro estudo nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (6 nm) foram adicionadas a fibroblastos da derme humana; no segundo nanotubos de carbono (5 – 20 nm) de parede simples foram aplicados em células epiteliais de tecido humano.

De forma geral, com o teste do MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue), onde o sal é convertido em “formazan” e

solubilizado, reação que expressa em percentual de células vivas de acordo com a absorvância (Castro et al., 2004) nas condições de tempo e concentração utilizadas foi possível avaliar a toxicidade das nanopartículas obtidas a partir da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18.

As partículas, tanto em tamanho micro (biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18) quanto nano, não inibiram o crescimento celular em grande parte das condições estabelecidas; ainda pode-se observar que a biomassa seca de *Spirulina* sp. é capaz de favorecer o crescimento das células de *Zebrafish* e, entre as amostras em tamanho nanométrico, a elaborada através da ultrahomogeneização da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 com água destilada foi a que apresentou melhores resultados em relação à viabilidade celular, apesar de maior tamanho.

## CONCLUSÃO

As nanopartículas B e C tiveram efeitos variados sobre as células de *Zebrafish* nas diferentes concentrações e tempos analisados, sendo que a nanopartícula C, preparada a partir da ultrahomogeneização da biomassa seca de *Spirulina* sp. LEB-18 com água destilada apresentou menor variação dos resultados. Assim, os autores acreditam que as nanopartículas elaboradas podem ser uma fonte alternativa de nutrientes à alimentação humana, em especial a preparada neste estudo através da homogeneização da biomassa com água destilada.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 472562/2012-6) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Protocolo nº 2485.271.13638.27022013) pelo apoio financeiro à execução deste trabalho.

**REFERENCIAS**

- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciência Básica Aplicada**, v. 29, n. 2, 109-117p., 2008.
- ASSIS, L.; M. de; ZAVAREZE, E. R.; HERNÁNDEZ-PRENTICE, C.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, 99-109p., 2012.
- AUFFAN, M.; DECOME, L.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; MEO, M.; BRIOIS, V.; CHANEAC, C.; OLIVI, L.; BERGE-LEFRANC, J.; BOTTA, A.; WIESNER, M.; BOTTERO, J.; **Environ. Sci. Technol.**, v.40, 4367p., 2010.
- BLASCO, C.; PICÓ, Y. Determining nanomaterials in food. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 30, n. 1, 84-99p., 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos** - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009.
- CASTRO, M. M. B.; AGUIAR, J. L. A.; MELO, F. A. D.; SILVA, W. T. F.; MARQUES, E; SILVA, D. B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **Revista Anais de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.49, n. 2, p. 73-78, 2004.
- CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, 269-280p., 2007.
- CHEN, C.; XING, G.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, B.; TANG, J.; JIA, G.; WANG, T.; SUN, J.; XING, LI.; YUAN, H.; GAO, Y.; MENG, H.; CHEN, Z.; ZHAO, F.; CHAI, Z.; FANG, X.; **Nano Lett**, v.5, p. 20., 2005.
- CREMASCO, M. A. **Operações unitárias em sistemas particulados e fluidomecânicos**. São Paulo: Blucher, 2012.
- DOTTO, G. L.; LIMA, E. C.; PINTO, L. A. A. Biosorption of food dyes onto *Spirulina platensis* nanoparticles: Equilibrium isotherm and thermodynamic analysis, **Bioresource Technology** , v.103, 123-130p., 2012.
- FDA - **Food and Drug Administration**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: junho de 2014.

- MACHADO, A. R. Avaliação biológica de *Spirulina* em tamanhos micro e nanométrico e estudo da sua encapsulação em lipossomas. Rio Grande, 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Z. Naturforsch.** v. 63, p.144–150, 2008.
- MOREIRA, L. M.; BEHLING, B. S.; RODRIGUES, R. S.; COSTA, J. A. V.; SOUZA-SOARES, L. A. de. *Spirulina* as a Protein Source in the Nutritional recovery of Wistar Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol.56, n.3: pp. 447-456, May-June 2013.
- NANOSCIENCE. Disponível em: < <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>>. Acesso em julho de 2014.
- PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.
- ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M.; SANTOS, J. W. DOS; MACHADO, F. DE B.; NAKAMURA, F. Y.; MORAES, C. DE; ZAGATTO, A. DE M.; FARIA, M. C.; AFONSO, M.; MELLO, M. A. R. de. Influência da ingestão de *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esportiva**, v. 10, n. 4, 258-263p. 2004.
- SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 1, 20-31p., 2007.
- SANGUANSRI; AUGUSTIN. Nanoscale materials development-a food industry perspective. **Food Science and Technology**, v. 17, 547-556p., 2006.
- SHATKIN, J. A. **Nanotechnology: Health and Environmental Risks**. Nova Iorque: CRC Press - Taylor and Francis Group, 167p., 2008.
- SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, 82-89p., 2009.
- TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S.; AFFONSO-MITIDIER, O. R.; RUMJANEK, V. M. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. **Photochemical Photobiology**, v. 69, 694-699p., 1999.

YEHIA, H. N.; DRAPER, R. K.; MIKORYAK, C.; WALKER, E. K.; BAJA, P.;  
MUSSELMAN, I. H.; DAIGREPONT, M. C.; DIECKMANN, G. R.; PANTANO, P.;  
**J. Nanobiotechnol**, v.5, n. 8, 2007.

## **CAPÍTULO IV**

#### 4. CONCLUSÃO GERAL

A *Spirulina* sp. LEB-18, cultivada em meio *Zarrouk*, representa uma excelente fonte nutricional, em especial ao conteúdo de proteínas, ferro e outros minerais;

A técnica de agitação mecânica é viável para obtenção de nanopartículas microalgais com tamanho médio na faixa de 200 a 300 nm;

A técnica de agitação mecânica e o solvente utilizado influenciam no perfil nutricional das nanopartículas;

A substituição do tampão fosfato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  por água destilada no preparo de nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 trouxe como vantagem a redução do teor de sódio;

Embora com diminuição no percentual da maioria dos nutrientes, a nanopartícula obtida através da homogeneização da biomassa de *Spirulina* sp. LEB-18 com água destilada pH 6,9 (C), a biodisponibilidade de ferro apresentou resultados favoráveis;

A nanopartícula C apresentou menor variação dos resultados obtidos na avaliação citotóxica;

Analisando todos os resultados em conjunto os autores acreditam que a nanopartícula elaborada através da homogeneização da biomassa de *Spirulina* sp. com água destilada pode ser uma importante fonte alternativa de nutrientes, principalmente de ferro biodisponível.

## **CAPÍTULO V**

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOM, T.; STEINER-ASIEDU, M.; SAKYU-DAWSON, E. Effect of fortification of maize with cowpea and iron on growth and anaemia status of children. **African Journal of Food Science**, v. 4. n. 4, p. 136-142, 2010.
- AL-DHABI, N. A.13). Heavy metals analysis in commercial *Spirulina* products for human consumption. **Journal of Biological Sciences**, 2013.
- ÁLFEREZ, A. J. M.; DÍAZ-CASTRO, J.; LÓPEZ-ALIAGA, I.; RODRÍGUEZ-FERRER, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, L.; CAMPOS, M. S. Development of nutritional iron deficiency in growing male rats: hematological parameters, iron bioavailability and oxidative defence. **British Journal of Nutrition**. p. 1-9, 2010.
- ALIMENTAÇÃO E SAÚDE INFANTIL.** Disponível em: <<http://alimentosaideinfantil.wordpress.com/tag/ferro/>>. Acesso em julho de 2014.
- ALMEIDA, M. R.; BORÉM, A.; FRANCO, G. R. **Biotecnologia e saúde**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda, 2004. 232p.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciência Básica Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 459-479, 2000.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis**, 17ª Edição, Washington, D. C., 2000. CD-ROM.
- ASSIS, L. M. **Atividade antioxidante de extratos de microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* e estudo da sua nanoencapsulação em lipossomas**. 2012. 83p. Tese (doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, 2012.
- ASSIS, L; M. de; ZAVAREZE, E. R.; HERNÁNDEZ-PRENTICE, C.; SOUZA-SOARES, L. A. de. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

- AUFFAN, M.; DECOME, L.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; MEO, M.; BRIOIS, V.; CHA-NEAC, C.; OLIVI, L.; BERGE-LEFRANC, J.; BOTTA, A.; WIESNER, M.; BOTTERO, J.; **Environmental Science and Technology**. v.40, p. 4367, 2010.
- AZEREDO, H. M. C. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, p. 1240–1253, 2009.
- BECKER, E. W. **Microalgae in human and animal nutrition**. In: RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science. p. 312-351, 2004.
- BELAY, A. O. Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal Applied of Phycology**, v. 5, p. 235- 41, 1993.
- BELAY, A. O. Y. **Mass culture of *Spirulina* outdoors. – The Earthrise Farms experience**. In: Vonshak, A., Ed. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, cell-biology and biotechnology. London. p. 131-158, 1997.
- BIANCHI, M.L.P.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, J.E.D. Considerações sobre a disponibilidade de ferro dos alimentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrição**, v. 42, n.2, p. 94-100, 1992.
- BLASCO, C.; PICÓ, Y. Determining nanomaterials in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 84-99, 2011.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p. 911-917, 1959.
- BONSOR, K.; STRICKLAND, J. Como funciona a nanotecnologia. Disponível em: < <http://ciencia.hsw.uol.com.br/nanotecnologia.htm>>. Acesso em: dezembro de 2014.
- BRAGA, E. O.; MENDONÇA, L. G. Discussion of the rational use of human diets, with focus to its main constituents: linseed and quinoa. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 32-43, 2010.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitaminas, minerais e proteínas a ser utilizada como parâmetro de ingestão desses nutrientes por indivíduos e diferentes grupos populacionais**. Portaria 33. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 13 de janeiro de 1998.

- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento técnico para fortificação de farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico. Resolução RDC 344. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 13 de dezembro de 2002.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009.
- BURJA, A.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J. WRITGHT, P. Marine cyanobacterias profilic source of natural products. **Tetrahedron**. v. 590, p. 9347-9377, 2001.
- CARVALHO, M. C.; BARACAT, E. C. E.; SGARBIERI, V. C. Anemia ferropriva e anemia de doença crônica: distúrbios do metabolismo de ferro. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, 54-63p., 2006.
- CASEY, C. E.; WALRAVENS, P. A. **Nutrition during infancy**. Philadelphia: Hanley&Belfus. 126p., 1988.
- CASTRO, M. M. B.; AGUIAR, J. L. A.; MELO, F. A. D.; SILVA, W. T. F.; MARQUES, E; SILVA, D. B. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **Revista Anais de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v.49, n. 2, p. 73-78, 2004.
- CHAU, C-F.; WU, S-H.; YEN, G-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.
- CHEN, C.; XING, G.; WANG, J.; ZHAO, Y.; LI, B.; TANG, J.; JIA, G.; WANG, T.; SUN, J.; XING, LI.; YUAN, H.; GAO, Y.; MENG, H.; CHEN, Z.; ZHAO, F.; CHAI, Z.; FANG, X.; **Nano Lett**, v.5, p. 20., 2005.
- COCATO, M. L; RÊ, M. I.; NETO, M. A. T.; CHIEBAO, H. P.; COLLI, C. Avaliação por métodos *in vitro* e *in vivo* da biodisponibilidade de sulfato ferroso microencapsulado. **Revista de Nutrição**. v. 20, n. 3, p. 239-247, 2007.
- COHEN, Z. **The chemicals of Spirulina**. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, p. 233, 1997.

- COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Arquivo Brasileiro de Ciência e Tecnologia**. v. 51, n. 2, p. 405-411, 2008.
- COOK, J.D.; DASSENKO, S.A.; WHITTAKER, P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 53, p. 106-111., 1991.
- CONNOR, S. L. The diet habit survey: a new method of dietary assessment that relates to plasma cholesterol changes. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 92, n. 1, p. 41-47, 1992.
- CREMASCO, M. A. **Operações unitárias em sistemas particulados e fluidomecânicos**. São Paulo: Blucher, 2012.
- DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetocerosmuelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados**. 2006. 83p. Tese (doutorado em Engenharia e de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- DOMENE, S. M. A.; ASSUMPÇÃO, D. Estimativa de ferro absorvível em dietas de pré-escolares residentes em bolsões de pobreza do município de Campinas. **Revista Nutrire.**, v. 33, n. 2, p. 75-86, 2008.
- COHEN, Z. **The chemicals of *Spirulina***. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, p. 233, 1997.
- DOTTO, G. L.; LIMA, E. C.; PINTO, L. A. A. Biosorption of food dyes onto *Spirulina platensis* nanoparticles: Equilibrium isotherm and thermodynamic analysis, **Bioresource Technology**.v.103, 123-130p., 2012.
- DOTTO, G. L. Biossorção de corantes alimentícios utilizando nanopartículas de *Spirulina platensis*. 2012. 120p. Tese (doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, 2012.
- DUARTE, L. S. Aleitamento materno e níveis de hemoglobina em crianças menores de 2 anos em município do estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 149-157, 2007.

- FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of modisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, 21-27p., 2012.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, n. 2, P. 103-112, 2008.
- FDA - **Food and Drug Administration**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: Agosto de 2011.
- FDA - **Food and Drug Administration**. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: junho de 2014.
- HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T.C.; HASAN, M. R. A. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for human and feeds for domestic animals and fish. **Fisheries and Aquaculture** , v. 1034, 2008.
- HENRIKSON, R. **Spirulina: food of the future**. 2<sup>nd</sup> Ed. Barcelona: Urano S.A. p. 222, 1994.
- JASSBY, A. **Spirulina: a model for microalgae as human food**. In: Algae and human affairs. Cambridge: Cambridge University Press, p. 179, 1988.
- KAPPOR, S. J.; MEHTA, U. Iron Status and growth of rats fed different dietary iron sources. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 29-34, 1993.
- KOKEL, D.; PETERSON, R. T. Chemobehaviouralphenomics and behavior-based psychiatric drug discovery in the Zebrafish. **Briefings in functional genomics an proteomics**, v. 7, n. 6, p. 483-490, 2008.
- LABORATORY OF BIOMOLECULAR SYSTEMS-UNESP**. Disponível em: [http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/xtal/texto\\_hb.php](http://www.biocristalografia.df.ibilce.unesp.br/xtal/texto_hb.php). Acesso em: julho de 2014.
- LBOUTOUNNE , H.; CHAULET , J.-F.; PLOTON , C.; FALSON , F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(e-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319–334, 2002.
- LEB-FURG. **Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande**. Disponível em: [http://www.leb.furg.br/proj\\_spiru.htm](http://www.leb.furg.br/proj_spiru.htm)>. Acesso em: junho de 2014

- LOBO, A. S.; TRAMONTE, V. L. C. Effects of supplementation and food fortification on mineral bioavailability. **Revista de Nutrição.**, v. 17, n. 1, p. 107-113, 2004.
- LUTEN, J.; CREWS, H.; FLYNN, A. Interlaboratory trial of the determination of the *in vitro* iron dialysability from food. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 72, n. 4, p. 415-424, 1996.
- MACHADO, A. A.; IZUMI, C.; FREITAS, O. Bases moleculares da absorção de ferro. **Alimentos e Nutrição.** v. 16. n. 3. P. 293-298, 2005.
- MACHADO, A. R. **Avaliação biológica de *Spirulina* em tamanhos micro e nanométrico e estudo da sua encapsulação em lipossomas.** 2012. 149f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, 2012.
- MADKOUR, F. F.; KAMIL, A. E.; NASR, H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 38, p. 51-77, 2012.
- MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. The importance of zinc in human nutrition. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.
- MAHAN, K. L.; ESCOTTI-STUMP, S. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia.** Rio de Janeiro: Elsevier, p. 549p, 2010.
- MARQUES, M. F.; MARQUES, M. M.; XAVIER, E. R.; GREGÓRIO, E. L. Fortificação de alimentos: uma alternativa para suprir as necessidades de micronutrientes no mundo contemporâneo. **HU Revista da Universidade de Juiz de Fora**, v. 38, n. 1, 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <  
[https://www.google.com.br/?gws\\_rd=ssl#q=Gloria+Valeria+da+Veiga+Instituto+de+Nutri%C3%A7%C3%A3o+Josu%C3%A9+de+castro++++Universidade+Federal+do+Rio+de+Janeiro+++++gvveiga%40globo.com](https://www.google.com.br/?gws_rd=ssl#q=Gloria+Valeria+da+Veiga+Instituto+de+Nutri%C3%A7%C3%A3o+Josu%C3%A9+de+castro++++Universidade+Federal+do+Rio+de+Janeiro+++++gvveiga%40globo.com)>. Acesso em: julho de 2014.
- MIRANDA, A. da S. Anemia ferropriva e estado nutricional de crianças com idade de 12 a 60 meses no município de viçosa, MG. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 163-169, 2003.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung.** v. 63, p. 144–150, 2008.

- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. p. 294, 60-64, 2009.
- MORAIS, M.G; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology**. v. 101, p. 2872-2876, 2010.
- MOREIRA, L. M.; ROCHA, A. S. R., RIBEIRO, C. L. G.; RODRIGUES, R.S.; SOUZA-SOARES, L.A. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina* platensis. **African Journal of Food Science**, v. 5, n. 15, p. 799–805, 2012.
- MOREIRA, L. M.; BEHLING, B. S.; RODRIGUES, R. S.; COSTA, J. A. V.; SOUZA-SOARES, L. A. de. *Spirulina* as a Protein Source in the Nutritional recovery of Wistar Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, n.3, p. 447-456, 2013.
- MOURA, J. G. P. **Nutrientes e Terapêuticos: como usá-los, quando usá-los, como avaliar suas carências, radicais livres na saúde humana**. Pelotas: Editora Visão Artes Gráficas, p. 322, 2006.
- MOURA, N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação da biodisponibilidade de ferro de feijão comum em comparação com carne bovina. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 2, p. 270-276, 2006.
- NANOSCIENCE**. Disponível em: < <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>>. Acesso em julho de 2014.
- NATURE REVIEWS**. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrg/journal/v14/n6/full/nrg3500.html>>. Acesso em julho de 2014.
- NAVES, L. P.; CORREA, A. D.; SANTOS, C. D.; ABREU, C. M. P. Antinutritional components and protein digestibility in pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*) submitted to different processing methods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., v.30, p. 180-184, 2010.
- NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v.34, p. 408-413, 2011.
- NEUMAN, N. A. Prevalência e Fatores de Risco para Anemia no Sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p.57-63, 2000.

- NILSON, E. A.; JAIME, P. C.; RESENDE, D. O. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para a redução do teor de sódio em alimentos processados. *Revista Panamericana de Salud Publica*. V. 34, n. 4, p. 287–92, 2012.
- OLIVEIRA, R. S. de. Magnitude, distribuição espacial e tendência da anemia em pré-escolares da Paraíba. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 26-32, 2002.
- OLIVEIRA, E. G.; ROSA, G. S.; ROSA, M. A.; PINTO, L. A. A. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1297–1303, 2009.
- OPAS – **Organización Panamericana de La Salud - Plan de acción para el control de la anemia por carencia de hierro en las Américas**. Washington, DC: OPAS, 1996.
- PANATO, C. S. S.; DENARDI, G. T. B.; NOZASKI, V. T. Prevalence of iron-deficiency anemia and consumption of iron in hospitalized children. **Revista de Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 1, p. 45-50, 2011.
- PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.
- PHANG, S. M.; MIAH, M.S.; CHUU, W.L.; HASHIN, M. *Spirulina* culture in digested starch factory waste water. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 395-400, 2000.
- PREDRAZA, D. F.; ROCHA, A.C.D.; QUEIROZ, E.O.; SOUSA, C.P.C. Zinc nutritional status in children attending public daycare centers in the state of Paraíba, Brazil. **Revista de Nutrição**, v. 24, n.4, p. 539-552, 2011.
- PERES, W. **Oligoelementos em bioquímica**. Pelotas: Universidade Católica de Pelotas; EDUCAT, p. 172, 1996.
- PUYFOULHOX, G.; ROUANET, J. M.; BESANCON, P.; BACCOU, J. C.; CAPORICCIO, B. Iron availability from Iron-fortified *Spirulina* by an *in vitro* digestion/Caco-2 cell culture model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 4, n. 3, p. 1625-29, 2001.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

- RAMÍREZ-MORENO, L.; OLVERA-RAMÍREZ, A. Uso actual y tradicional de *Spirulina* sp. **Interciencia – Revista de Ciencia y Tecnología de América**. V. 31, n. 9, p. 657-663, 2006.
- ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 337–346, 2003.
- ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M.; SANTOS, J. W. DOS; MACHADO, F. DE B.; NAKAMURA, F. Y.; MORAES, C. DE; ZAGATTO, A. DE M.; FARIA, M. C.; AFONSO, M.; MELLO, M. A. R. de. Influência da ingestão de *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esportiva**, v. 10, n. 4, 258-263p. 2004.
- ROHNER, F.; ERNEST, F. O.; ARNOLD, M.; HILBE, M.; BIEBINGER, R.; EHRENSPERGER, F.; PRATSINIS, S. E.; LANGHANS, W.; HURRELL, R. F.; ZIMMERMANN, M. B. Synthesis, characterization and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles. **Nutrient physiology, metabolism and nutrient interactions**, v. 137, p. 614-619, 2007.
- SAHOO, S.K.; PARVEEN, S.; PANDA, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.
- SAMPAIO, C. R. P. **Desenvolvimento e estudo das características sensoriais e nutricionais de barras de cereais fortificadas com ferro**. 2009. 88p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, 2009.
- SANGUANSRI; AUGUSTIN. Nanoscale materials development-a food industry perspective. **Food Science and Technology**, v. 17, p. 547-556, 2006.
- SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71–80, 2000.
- SANTOS, E. P.; BARBOZA, J. C. S. Avaliação do Uso de Amidos Aniônicos Hidrolisados como Estabilizantes em Nanocápsulas Poliméricas para Formulações Tópicas. **Polímeros**, v. 23, n.5, p. 624-629, 2013.
- SARNO, F. **Estimativas do consumo de sódio no Brasil, revisão dos benefícios relacionados à limitação do consumo deste nutriente na Síndrome Metabólica e**

- avaliação do impacto de intervenção no local de trabalho.** 2010. 99f. Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública). Universidade Federal de São Paulo, 2010.
- SCHAFFAZICK, S. R.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SHATKIN, J. A. **Nanotechnology: Health and Environmental Risks**. Nova Iorque: CRC Press - Taylor and Francis Group, 167p., 2008.
- SILVA, F. C. da. Proporção de anemia de acordo com o estadiamento puberal, segundo dois critérios diagnósticos. **Rev. Nutr.**, v. 20, n. 3, 2007.
- SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, 2009.
- TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ª Edição revisada e ampliada. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. P. 161, 2011.
- THEIL, E. C. Iron, ferritin, and nutrition. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 327-343, 2004.
- TRINDADE, G. S.; CAPELLA, M. A. M.; CAPELLA, L. S.; AFFONSO-MITIDIER, O. R.; RUMJANEK, V. M. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. **Photochemical Photobiology**, v. 69, p. 694-699, 1999.
- UNICEF - **Fundo das Nações Unidas para a Infância. Situação Mundial da Infância - A Nutrição em Foco**. Brasília, DF: UNICEF, 1998.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICTORIA. CANADÁ. Disponível em: <[http://web.uvic.ca/water/publications/phytogallery/phyto\\_gallery.html](http://web.uvic.ca/water/publications/phytogallery/phyto_gallery.html)>. Acesso em julho de 2014.
- VELLOZO, E. P.; BRAGA, J. A. P.; FISBERG, M. Prevenção da anemia ferropriva através de uma intervenção comunitária: impacto de um suplemento enriquecido com ferro e efetividade de ações educativas em nutrição e saúde. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 38, p. 100 – 120, 2013.
- VENEZUELA, T. C. **Determinação de contaminantes metálicos (metal tóxico) num solo adubado com composto de lixo em área olerícola no município de nova friburgo.**

2001. 96p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

YEHIA, H. N.; DRAPER, R. K.; MIKORYAK, C.; WALKER, E. K.; BAJA, P.; MUSSELMAN, I. H.; DAIGREPONT, M. C.; DIECKMANN, G. R.; PANTANO, P.; **J. Nanobiotechnology**, v.5, n. 8, 2007.

WADHWA, S.; JAIN, A.; WOODWARD, J.G.; MUMPER, R.J Lipid nanocapsule as vaccine carriers for his-tagged proteins: Evaluation of antigen-specific immune responses to HIV I His-Gag p41 and systemic inflammatory responses. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 315–322, 2012.

WEBER, G. E. B. **Nanotubos de carbono de parede simples funcionalizados com polietilenoglicol: avaliação de parâmetros *in vitro* e *in vivo***. 2013. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal do Rio Grande, 2013.

WEGMULLER, R.; ZIMMERMANN, M. B.; MORETTI, D.; ARNOLD, M.; LANGHANS, W.; HURREL, R. Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric pyrophosphate in rats. **Nutrient metabolism**. v. 134, p. 3301-3304, 2004.

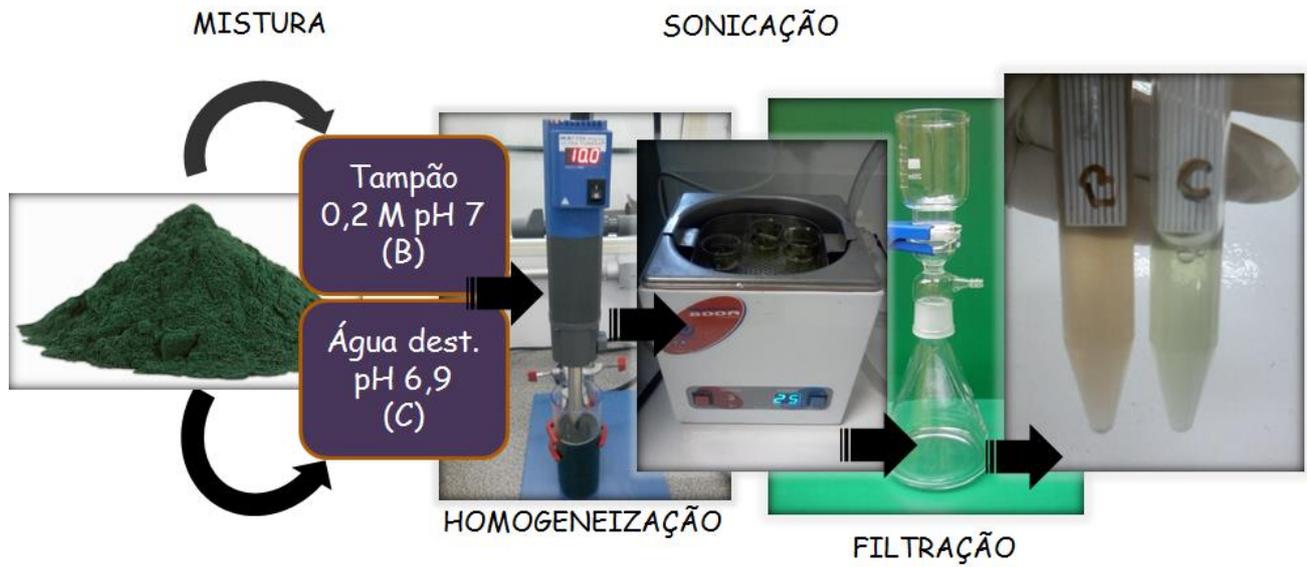
ZARROUK, C. **Contribution à l'étuded'unecyanophycée.Influence de divers facteursphysiquesetchimiquessur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***, 1996. 103f. Tese (PhD), Universidade de Paris, 1996.

ZAVARESE, E. R. **Aplicação de hidrolisado proteico com peptídeos bioativos nanoencapsulados em filmes elaborados a partir de proteínas de pescado**. 2012. 116p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, 2012.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 7107-7111, 2010.

**APÊNDICES**

**APÊNDICE 1 – Processo de obtenção de nanopartículas de *Spirulina* sp. LEB-18 pelo método mecânico de ultrahomogeneização**



**APÊNDICE 2 – Suspensão de nanopartículas preparadas por meio da homogeneização de biomassa microalgal com solução tampão fosfato de sódio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 (b) e água destilada pH 6,9 (c), respectivamente.**



**ANEXO**