

Suplementação da biomassa de spirulina platensis em ratos sedentários e treinados como fator antioxidante**Supplementation of spirulina platensis biomass in sedentary and trained rats as an antioxidant factor**

DOI:10.34117/bjdv6n5-289

Recebimento dos originais: 10/04/2020

Aceitação para publicação: 15/05/2020

Irinaldo Capitulino de Souza

Bacharel em Educação Física. Pós-graduando em Educação Física Hospitalar

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Campus I - Lot. Cidade Universitaria, PB, 58051-900

E-mail: irinaldocsouza@gmail.com

Vitória Polliany de Oliveira Silva

Enfermeira, Graduada pela Faculdade Internacional da Paraíba

Instituição: Faculdade Internacional da Paraíba

Endereço: Rua Sargento Antônio Porto, nº 657, Jardim Aeroporto, Bayeux-PB, Brasil

E-mail: vitoriaa_polly@outlook.com

Robson Prazeres de Lemos Segundo

Acadêmico de Medicina pela Faculdade de Medicina Nova Esperança

Instituição: Faculdade de Medicina Nova Esperança

Endereço: Avenida São Gonçalo, 1021 - Manaíra, João Pessoa - PB, Brasil

E-mail: robson.segundo@hotmail.com

Jéssica Pereira da Silva

Acadêmica de Medicina na Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande

Endereço: Avenida São Paulo- 1317, Bairro dos estados, João Pessoa-PB, Brasil

E-mail: pereira18jessica@gmail.com

Ana Patricia Gomes Clementino

Fisioterapeuta. Especialista em Fisioterapia Cardiorrespiratória pelo UNIPÊ

Instituição: Centro Universitário de João Pessoa

Endereço: Avenida Geraldo Costa, 420, Manaíra. Apt 602 B, Edf. Príncipe de Veneza

E-mail: anapaty.gomes@bol.com.br

Ruthchelly Tavares da Silva

Tecnóloga em Alimentos. Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Rua Maria Alcira Lacerda Cardoso 169, Ap. 406 - José Américo, João Pessoa - PB, Brasil.

E-mail: ruthchelly23@gmail.com

Janaína de Moura Fernandes

Tecnóloga em Alimentos. Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal da Paraíba

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Rua Edson Honório Cordeiro Filho, 37. Bairro: João Paulo II, João Pessoa - PB.

E-mail: janamoura2011@hotmail.com

João andrade da Silva

Engenheiro de Alimentos. Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas. Docente da Universidade Federal da Paraíba

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Campus I - Lot. Cidade Universitaria, PB, 58051-900

E-mail: joaoctdr@gmail.com

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio quando ultrapassam as defesas antioxidantes, causa o estresse oxidativo. A *Spirulina platensis* possui fatores antioxidantes, tais como, carotenóides, fenólicos totais entre outras enzimas capazes de atenuar o estresse oxidativo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antioxidante da biomassa da *Spirulina platensis* cultivada em laboratório comparando-a com a *Spirulina platensis* comercial, por meio da captura dos radicais livres DPPH e o teor de fenólicos totais. Nesta pesquisa foi realizada a extração dos componentes antioxidante da biomassa cultivada e da comercial das respectivas amostras; SBH (*Spirulina* biomassa extrato hexano), SBE (*Spirulina* biomassa extrato etanol), SBA (*Spirulina* biomassa extrato água), SCH (*Spirulina* comercial extrato hexano), SCE (*Spirulina* comercial extrato etanol) e SCA (*Spirulina* comercial extrato água). O teor de fenólicos para SBH foi de 14,41 mg EAG.g⁻¹, porém como não houve rendimento de extrato para a biomassa comercial (SCH) não foi possível determinar seu teor de fenólicos totais. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de fenólicos totais nos extratos de etanol da SBE e SCE, mas para o extratos de água foi observado um maior teor de fenólicos para SBA (17,10 mg EAG.g⁻¹) diferindo significativamente da SBA (6,20 mg EAG.g⁻¹). A atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH para SBH foi de 64,43 $\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$, não sendo determinado para SCH pois não houve rendimento de extrato. A atividade antioxidante máxima foram observados nos dois extratos da biomassa cultivada SBE e SBA com valores de 113,37 e 17,17 $\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$, respectivamente, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos seus correspondentes de biomassa comercial. Assim, é possível inferir que os compostos fenólicos extraídos com o solvente etanol contribuíram para a capacidade antioxidante na microalga *Spirulina platensis*. Embora os compostos fenólicos tenham apresentando uma relação positiva com a atividade antioxidante, é importante ressaltar que essa microalga também produz uma grande variedade de outros compostos antioxidantes, incluindo, por exemplo, os carotenóides, ácidos gordos poli-insaturados e os polissacarídeos, podendo ser estes outros compostos os responsáveis pela atividade antioxidante no extrato de água.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*. Fenólicos totais. DPPH.

ABSTRACT

Reactive oxygen species when they overcome antioxidant defenses, cause oxidative stress. *Spirulina platensis* has antioxidant factors, such as carotenoids, total phenolics and other enzymes capable of attenuating oxidative stress. The objective of this research was to evaluate the antioxidant activity of the biomass of *Spirulina platensis* grown in the laboratory by comparing it with commercial *Spirulina platensis*, by capturing DPPH free radicals and the total phenolic content. In this research, the extraction of the antioxidant components from the cultivated and commercial biomass from the respective samples was carried out; SBH (*Spirulina* biomass extract hexane), SBE (*Spirulina* biomass

extract ethanol), SBA (Spirulina biomass extract water), SCH (Spirulina commercial extract hexane), SCE (Spirulina commercial extract ethanol) and SCA (Spirulina commercial extract water). The phenolic content for SBH was 14.41 mg EAG.g-1, but as there was no extract yield for commercial biomass (SCH) it was not possible to determine its total phenolic content. There was no significant difference ($p < 0.05$) between the levels of total phenolics in the ethanol extracts from SBE and SCE, but for water extracts a higher phenolic content was observed for SBA (17.10 mg EAG.g-1) differing significantly from the SBA (6.20 mg EAG.g-1). The antioxidant activity by the free radical scavenging DPPH for SBH was 64.43 $\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$, not being determined for SCH as there was no extract yield. The maximum antioxidant activity was observed in the two extracts of the cultivated biomass SBE and SBA with values of 113.37 and 17.17 $\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$, respectively, differing significantly ($p < 0.05$) from their corresponding commercial biomass between. Thus, it is possible to infer that the phenolic compounds extracted with the ethanol solvent contributed to the antioxidant capacity in the microalgae *Spirulina platensis*. Although phenolic compounds have a possible relationship with antioxidant activity, it is important to note that this microalgae also produces a wide variety of other antioxidant compounds, including, for example, carotenoids, polyunsaturated fatty acids and polysaccharides, which may be other compounds responsible for the antioxidant activity in the water extract.

Keywords: *Spirulina platensis*. Total phenolics. DPPH.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são consideradas matérias primas de grande importância devido às funções diversificadas. Possuem atividades fotossintéticas, sendo consideradas o principal organismo primário como produtores de matéria orgânica em ambiente aquático (LÓPEZ et al., 2014), pelo alto nível metabolicamente e atividades biológica (YINGYING et al., 2014).

De acordo com Vasconcelos et al., (2007) os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio estão bastante esclarecidos na literatura especializada. Mas, as espécies reativas de oxigênio também possuem suas funções benéficas integradas ao metabolismo humano, tais como, fagocitose (espécies produzidas com capacidade de eliminar o agente agressor) em diversas condições fisiológicas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) se tornam nocivas, quando há um aumento de sua produção que resulta no desequilíbrio danoso no sistema pró e antioxidante.

Fontes naturais de antioxidantes são exploradas com o objetivo de evitar a deterioração oxidativa dos organismos vivos. Um alimento que ganha bastante destaque em relação a ações antioxidantes são as microalgas, sendo alvo de diversas pesquisas. Além de ações antioxidantes, elas destacam-se pela quantidade de compostos bioativos, tais como, ácidos graxos poli-insaturados, b-caroteno, polissacarídeos sulfatados e esteróis (CHATTERJEE; BHATTCHARJEE, 2013).

O metabolismo humano e fontes exógenas tem a capacidade de produzir espécies reativas de oxigênios, tais como, oxigênio singuleto ($^1\text{O}_2$), radicais superóxido (O_2^\ominus), radicais hidroxilo ($\text{OH}\bullet$), e peróxido de hidroxilo (H_2O_2) que se ligam a macromoléculas e provocam danos celulares. Alguns antioxidantes estão sendo pesquisados como agentes capazes de reduzir as espécies reativas de

oxigênios no corpo humano. A função do antioxidante é a proteção contra estresse oxidativo e aumenta consequentemente a defesa das células do corpo humano (YINGYING et al., 2014).

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antioxidante da biomassa da *Spirulina platensis* cultivada em laboratório comparando-a com a *Spirulina platensis* comercial, por meio da captura dos radicais livres DPPH e o teor de fenólicos totais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICROALGAS

Alguns alimentos se tornam objeto de pesquisa por apresentar em suas composições, compostos bioativos capazes de atenuar fatores patológicos, causados por uma má alimentação. Compostos, tais como, polifenóis, carotenoide, peptídeos, antioxidantes, antiatividades inflamatórias ou antiproliferativos, esteroides ou ácidos graxos poliinsaturados encontrados nesses alimentos. São sugeridos positivamente contra doenças cardiovasculares, neurodegeneração e câncer em diferentes pesquisas realizadas em seres humanos (HERRERO et al, 2015).

Algumas microalgas são consideradas detentoras desses fatores. Em sua composição, estão presentes compostos capazes de beneficiar à saúde humana. As microalgas pertencem a um grupo heterogêneo predominante aquático. São geralmente microscópicos unicelulares, procariontes ou eucariontes que podem ou não formar colônias. Apresentam pouca ou nenhuma diferenciação celular e possuem pigmentos responsáveis pela coloração variada e metabolismo fotoautotrófico (BARCELLOS et al. 2012). Tem capacidade de converter o CO₂ em proteínas e lipídeos que podem ser transformados em alimentos e ração de alto valor biológico. Algumas espécies apresentam crescimento extremamente rápido e pode até duplicar sua biomassa em 24hs (BILAD et al. 2014).

O cultivo de microalgas tem despertado o interesse dos pesquisadores e do meio industrial. Em função do alto valor nutricional que a biomassa apresenta. Essa biomassa pode ser utilizada na produção de alimentos e de outros compostos naturais para comercialização. Os compostos; ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais, além de apresentar ações antioxidantes, caracterizam essa biomassa como alimento funcional (BARCELLOS et al. 2012).

O interesse pelas microalgas cresce pelo fato dos lipídeos encontrados em sua composição, possuem energias armazenadas por átomos de carbono duas vezes mais que os carboidratos. Podendo favorecer o aumento substancial em energia de combustão em relação às plantas terrestres para a produção de bicompostíveis (RAWAT et al. 2013).

As microalgas apresentam ações antioxidantes naturais, onde duas espécies são cultivadas para a produção de carotenoides, tais como, *Dunaliella* que produz o (beta-caroteno) e a *Haematococcus*

que produz (astaxantina). Além dos carotenoides, as microalgas apresentam em adição, outros pigmentos com funções antioxidantes, potencialmente valiosos, tais como, os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos. Os tocoferóis são encontrados em óleos comestíveis para evitar a oxidação dos radicais livres nas células humanas. A quantidade de vitamina (E) encontrada nas microalgas é maior do que a encontrada em óleos virgens de oliva (GOIRIS et al. 2015).

De acordo com Raposo e Moraes (2014) outro fator superimportante em relação à biomassa das microalgas são os compostos fitoquímicos contidos em sua composição. As doenças degenerativas não transmissíveis, tais como hipertensão, diabetes mellitus e câncer, causadas muitas vezes por uma má alimentação, têm aumentado os números de óbitos no país. As microalgas apresentam compostos fitoquímicos que podem reduzir e prevenir os riscos de doenças cardiovasculares e cerebrais. Os compostos fitoquímicos encontram-se em legumes, frutas e em maior concentração em microalgas e outras cianobacterias. Apesar de sua grande riqueza em compostos fitoquímicos e fitonutrientes, enzimas antioxidantes, vitaminas, carotenoides e polissacarídeos, compostos fenólicos e esteróis, as microalgas não recebem a atenção que merecem em relação aos benefícios e prevenção de risco para a saúde dos seres humanos.

As microalgas se destacam nas indústrias de alimentos, por apresentarem grandes produtividades e baixo custo. Devido ao baixo custo o consumo e o processo de produção são muito amplos, contribuindo assim como alimentos para a população mundial. Podendo ser como biocatalisadores, em sínteses químicas, na produção de enzimas ou como fonte de proteínas (VILCHEZ et al, 1997).

2.2 A IMPORTÂNCIA DOS ANTIOXIDANTES EXTRAÍDOS DAS MICROALGAS

Nos últimos anos, tem havido muito interesse por alimentos que apresentam ações antioxidantes. Em pesquisas voltadas para o combate de doenças epidemiológicas, a ingestão de alguns alimentos que contêm vitaminas, minerais e outros compostos capazes de combater o estresse oxidativo e proteger o organismo contra doenças cardíacas, câncer e envelhecimento celular, tem apresentado grande relevância. Alimentos com ações antioxidantes tem a capacidade de inibir as espécies reativas de oxigênio causadas pelo estresse oxidativo. Devido a esta função, alimentos que contêm ações antioxidantes são bastante pesquisados e consumidos, com objetivo de proteger as células do estresse oxidativo (GAD et al., 2011). Além de sua função antioxidante, os carotenoides apresentam outras funções, tais como, prevenção a células cancerígenas por meio do (b-caroteno, luteína e zeaxantina), envelhecimento celular e prevenção contra doenças cardíacas, por meio da (vitamina E) (CAMPO; 2000).

Microalgas e cianobactérias contêm funções antioxidantes naturais de grandes diversidades bioquímicas. Elas possuem a capacidade de respostas adaptativa acelerada em relação ao combate do estresse oxidativo. Isso ocorre pela ativação do seu sistema de defesa antioxidante intrínseca. A maioria dos antioxidantes é a-polar. O antioxidante é extraído utilizando o etanol, que demonstra alta afinidade para a extração de antioxidante em microalgas *Haematococcus*. O etanol é também considerado um dos solventes mais utilizados para processamento de subprodutos agrícolas (GUEDES et al., 2013).

O organismo humano apresenta redução e oxidação natural para as atividades funcionais e essenciais do metabolismo. Mas, quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante, o organismo promove o estresse oxidativo. É importante que tenhamos conhecimento sobre alguns fatores que podem influenciar tanto na produção como no aumento desses radicais livres. Fatores, tais como, defeitos na respiração mitocondrial, metabolismo do ácido araquidônico, ativação-inibição enzimático. Além destes fatores, temos que levar em consideração os fatores exógenos na contribuição para a produção desses radicais livres, tais como, poluição, fumo, exercícios de alta intensidade, bebida alcoólica e má nutrição. Por meio de fatores endógeno e exógeno, podemos combater o excesso de radicais livres por enzimas antioxidantes. Essas enzimas reagem de forma acelerada, fazendo com que os radicais livres não possam reagir com as moléculas biológicas, evitando-se produtos reativos (OLIVEIRA et al., 2013)

Algumas algas são consideradas ricas em antioxidantes naturais, contribuindo para a segurança da saúde humana. As microalgas são indicadas como antioxidantes naturais e seguras, pelo fato de serem cultivadas em biorreatores que mantêm sua qualidade e controle celular. De modo que esse processo ocorra sem a presença de herbicida e pesticida ou quaisquer outras substâncias tóxicas (LI et al., 2007).

Espécies reativas de oxigênio são relacionadas a danos celulares e a produção de doenças fatais no nosso organismo. Devido a esse fator de degradação, aumenta-se o interesse dos pesquisadores para avaliar as ações antioxidantes das microalgas. Todas as espécies possuem uma característica peculiar em relação às enzimas encontradas. De acordo com Cuaresma et al., (2006) a espécie *Chlamydomonas acidophila* apresenta em suas composição; b-carotene, luteína, zaxantina e caroteno, apresentando os mesmo carotenoides de *Scenedesmus* (LOURENCIO et al., 2009). Já *Chloccocum* de acordo com Bin e Chen (2001) contem algumas enzimas anteriormente encontradas na *Chlamydomonas*, mas apresentando algumas enzimas antioxidantes a mais, tais como, astaxantina, zeaxantina e cantoxantina. A *Chlorella vulgare* bastante popular no Japão, também apresenta marcadores antioxidantes, tais como, superóxido dismutase e catalase (O et al., 2010).

2.3 SPIRULINA PLATENSIS E ANTIOXIDANTE

A biomassa da *Spirulina platensis* é um alimento de alta qualidade biológica. Contendo altos teores de proteínas (70%) (ANDRADE; COSTA; 2008), vitaminas (biotina, ácido fólico, inositol, vitamina E e B12) e ácidos graxos poliinsaturados (WANG et. al. 2007). Rica em minerais (zinco, magnésio, manganês, selênio e ferro (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015), clorofila, carotenoides, hidrato de carbono, esteróis, pigmentos aloficocianina, (PEIRETTI; MEINERI; 2011), ácido c-linolênico e ficobiliproteínas (SU et al 2014), β -caroteno, ficocianina, tocoferóis e superóxido dismutase que são os responsáveis por ações antioxidantes (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015). Além de conter antioxidantes e vitaminas, essa biomassa contém também polissacarídeos sulfatados que são antivirais e esteróis que apresentam funções antimicrobianas. De acordo com Yeganeh; Teimouri; Amirkolaie, (2015) a *Spirulina platensis* pode regular o sistema imunológico celular em respostas (interleucina 1 β e factor de necrose tumoral (TNF) – α genes), imunomoduladoras, biomoduladoras, e propriedades anticancerígenas (IBRAHEM et al. 2013). Além de prevenir aterosclerose, níveis elevados de colesterol e triglicérides e doenças cardíacas (COLLA et. al, 2007).. A biomassa da *S. platensis* é classificada pela FDA como GRAS (Generally Recognized as Safe) um alimento que garante total segurança à população quanto ao seu consumo sem risco a saúde (ANDRADE; COSTA; 2008).

A produção da biomassa da *Spirulina platensis* ocorre em três etapas quais sejam: cultivo, colheita e processamento. Países como os Estados Unidos, Tailândia, Índia, China, Paquistão, Taiwan e Birmânia são os maiores produtores e consumidores comerciais de *Spirulina platensis*. (RAVI et. al. 2010). Segundo RAVI et. al. (2010) se faz necessário à realização de mais pesquisas com alimentos utilizados como suplemento. A *Spirulina platensis* é a única alga azul-verde que pode ser cultivada e comercializada como alimento, com funções benéficas à saúde humana.

O estresse oxidativo influencia diretamente o envelhecimento e as doenças degenerativas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham papel chave nas lesões teciduais e inflamações após a prática de exercícios intensos. Os suplementos têm sido consumidos pelos atletas em suas dietas por conter componentes capazes de neutralizar essa ação oxidativa induzida pelo exercício (MEIHUA; SHILIAN; DUODUO; 2013). O exercício contribui com a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) contribuindo para a fadiga muscular. Para se defender do dano oxidativo induzido pelo exercício, às células têm defesas endógenas e a contribuição dos antioxidantes exógenos que interagem na defesa criando uma rede antioxidante celular (KALAFATI et. al. 2010).

Existem enzimas de defesa contra os radicais de espécies reativos de oxigênio (ERO) produzidos nas células como parte dos processos metabólicos. Essas enzimas, tais como a catalase,

superóxido dismutase, glutatona peroxidase, entre outras substâncias não enzimáticas tais como, vitaminas A, E, C, glutatona, ubiquinona e flavonóides, reagem contra os radicais livres como na defesa antioxidante. O desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e o antioxidante, causado pelo exercício é denominado estresse oxidativo (LIPING et. al. 2011). O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antioxidante da biomassa da *Spirulina platensis* em relação da *Spirulina* comercial. Teve como objetivo específico; cultivo da biomassa da *Spirulina platensis* em meio sintético, extração de antioxidantes a partir da biomassa *Spirulina platensis* e comercial e atividade antioxidante. E foi desenvolvida Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas – LARBIM. A biomassa foi cultivada no próprio laboratório e a *Spirulina* comercial foi adquirida no comercial de João Pessoa.

3 METODOLOGIA

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas – LARBIM/CCEN/UFPB.

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

A cepa da microalga *Spirulina platensis* utilizada para obtenção de biomassa cultivada em laboratório foi obtida no banco de cultura de microalgas do LEA. A biomassa comercial de *Spirulina platensis* foi obtida no comércio de João Pessoa.

3.2 PREPARAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

O meio básico para o cultivo da *Spirulina platensis* para a produção da biomassa utilizada na pesquisa foi o meio Zarrouk (ZARROUK, 1996) preparado com água destilada autoclavada.

3.3 EXTRAÇÃO LABORATORIAIS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA

O crescimento da *Spirulina platensis* foi efetuado em câmara de cultura climatizada ($24 \pm 1^\circ \text{C}$) sob intensidade luminosa de aproximadamente $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W e fotoperíodo com ciclo de 12 h claro/escuro, em balão de 6 litros com 5 litros de meio de cultura, com injeção contínua de ar ($2,0 \text{ mL.min}^{-1}$) através de um minicompressor de membrana Resun AOC2. O acompanhamento do cultivo foi realizado por meio de contagens celulares em câmaras Sedgewick-Rafter (espécies filamentosas), em microscópio binocular Leica, e medidas da fluorescência *in vivo* usando um fluorômetro Turner Design 10005 R. Durante as contagens em microscópio também foram efetuadas observações do estado fisiológico das células, avaliando-se aspectos da sua morfologia e tamanho e as espécies sendo fotografadas usando sistema

de captura de imagem acoplado ao microscópio. A curva de crescimento foi traçada utilizando os parâmetros de crescimento acima referidos, a partir das quais foi possível determinar o tempo de cultivo, a duração da fase exponencial, a velocidade de crescimento (k) e o rendimento final em biomassa. A velocidade de crescimento (k), a qual representa o número de divisões celulares da população em estudo por unidade de tempo (dia), foi determinada pela seguinte fórmula, citada em Stein (1973).

$$k = 3,322 \cdot \frac{T_2 - T_1}{\log N_2 / N_1} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde, k representa a velocidade de crescimento, 3,322 é o fator de conversão do logaritmo de 2 na base 10, T1 e T2 correspondem ao tempo inicial e final da fase exponencial de crescimento; N1 e N2 referem-se à densidade celular inicial e final da mesma fase, respectivamente. A densidade celular máxima (DCM) foi definida como o valor máximo obtido em número de células por mililitro ao final do cultivo e a produtividade de biomassa (PB) foi definida como o valor da biomassa seca em gramas por litro de cultivo. O tempo de cultivo foi determinado com base no número de dias decorridos desde a inoculação até o período o qual foi alcançada a densidade celular máxima.

Quando o cultivo atingiu o início da fase estacionária do crescimento, o cultivo foi interrompido e o material centrifugado em centrífuga refrigerada Novatecnica NT825 (20 °C, 3500 rpm por 20 min), sendo o sobrenadante descartado e o precipitado congelado a -40 °C Terroni modelo 90LT-40C e posteriormente seca em Liofilizador Terroni modelo LS3000, operando a uma temperatura de -40 °C, pressão de 0,0966 mmHg e percentual de vácuo de 99,99. A biomassa seca foi pesada e guardada em recipiente hermético até o momento das análises.

3.4 EXTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

3.4.1 Obtenção dos extratos antioxidantes

As biomassas cultivadas e comercial da microalga *Spirulina platensis* foram submetidas a uma extração sequenciada em gradiente crescente de polaridade para a obtenção dos extratos de antioxidantes. Foram pesados 1,0 g de cada amostra e a elas adicionado 40,0 mL de hexano (HE) sendo sonicadas em banho de gelo (Unique, modelo USC-1400A) por 20 min. Para extração, foi realizada três horas de agitação a 25 °C, seguido da centrifugação do extrato à 8000 rpm por 10 min e o sobrenadante recuperado, depois de repetir o processo de extração, os dois sobrenadantes foram combinados. O resíduo foi subsequentemente extraído duas vezes com 40,0 mL de etanol (EE) seguido por 40,0 mL de água destilada (WE) nas mesmas condições anteriormente descritas. Os extratos foram secos em estufa de circulação de ar Solab SL102 a 35 °C sendo em seguida

armazenados, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente até o momento de sua utilização. Cada extrato foi preparado na concentração de 5 mg.mL⁻¹ em água e armazenadas em frascos âmbar, sob uma atmosfera inerte até à sua utilização. Todo o procedimento de extração foi executado em baixa iluminação.

3.4.2 Determinação dos compostos fenólicos extraíveis totais

Os teores de fenólicos totais extraíveis (TEP) foram determinados pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu (SLINKARD; SINGLETON, 1977). Uma alíquota de 240 µL de cada extrato foi colocada em tubo de ensaio e a elas adicionadas 60 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, após 1 min de agitação seguiu-se com a adição de 2520 µL de água destilada e 180 µL de carbonato de sódio a 15%. A mistura foi agitada e mantida ao abrigo da luz durante duas horas. A medida de absorvância foi realizada em UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S), no comprimento de onda de 760 nm. A concentração de compostos fenólicos foi estimada utilizando uma calibração de curva padrão com ácido gálico (2-200 mg.L⁻¹) sendo obtida nas mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg EAG.g⁻¹ (miligrama de equivalente de ácido gálico por grama do extrato).

3.4.3 Determinação da capacidade antioxidante pela atividade sequestrante do radical livre DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir das microalgas foi determinada de acordo com Brand-Willams, Cuvelier e Berset (1995), que consiste na capacidade que os antioxidantes presentes nas amostras possuem em seqüestrar o radical estável DPPH•. A partir de triagem preliminar, a solução de DPPH• (23,6 µg.mL⁻¹ em EtOH) foi adicionada às amostras do extrato obtendo uma concentração final de 150 µg.mL⁻¹. Em triplicata, alíquotas de 90 µL dos extratos foram misturadas com 210 µL de etanol e 2.700 µL da solução de DPPH• (23,6 µg.mL⁻¹ em EtOH). Após 30 minutos foi efetuada a leitura a 517 nm, em espectrofotômetro UV-VIS (Thermo Fisher Scientific, modelo Evolution 60S). A curva controle foi preparada utilizando Trolox em concentrações de 0,5 a 5 µg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos pela determinação da %AAT (percentual atividade antioxidante total) (equação 2):

$$\%AAT = 100 \times \left(\frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde Abscontrole é a absorvância da solução etanólica do radical DPPH• e Absamostra é a absorvância do radical na presença do extrato ou do Trolox.

3.4.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata, em três ocasiões diferentes. Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão, submetidos a Test-T para comparação entre os extratos das biomassas cultivadas e comercial, considerando $p < 0,05$ utilizando o software Statistica 7.0. O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi calculado entre os fenólicos extraíveis totais e os métodos utilizados que avaliar a capacidade antioxidante.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS DO CULTIVO

A tabela 1 evidencia os dados do cultivo em laboratório da *Spirulina platensis*.

Tabela 1 - Dados de cultivo em laboratório da *Spirulina platensis* apresentando: velocidade de crescimento (k), duração da fase exponencial de crescimento em dias (Fase Log), Tempo de cultivo, total de biomassa seca produzida (mg.L^{-1}).

Espécie	k	Duração da Fase Log (dias)	Tempo de cultivo	Rendimento de Biomassa (mg.L^{-1})
<i>Spirulina platensis</i>	$1,44 \pm 0,13$	3	11	300

Fonte: Dados da Pesquisa

4.2 EXTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

Os resultados da extração dos compostos fenólicos da biomassa *Spirulina platensis* cultivada em laboratório e da biomassa comercial estão descritas na Tabela 1. Foram realizadas extração com hexano, etanol e água, tanto para a biomassa obtida no laboratório como para a biomassa comercial.

Tabela 2- Teor de fenólico total (mg EAG.g^{-1}) das biomassas de *Spirulina platensis* cultivada e comercial para os extratos de hexano (SBH e SCH), etanol (SBE e SCE) e água (SBA e SCA), ao nível de probabilidade de $p < 0,05$.

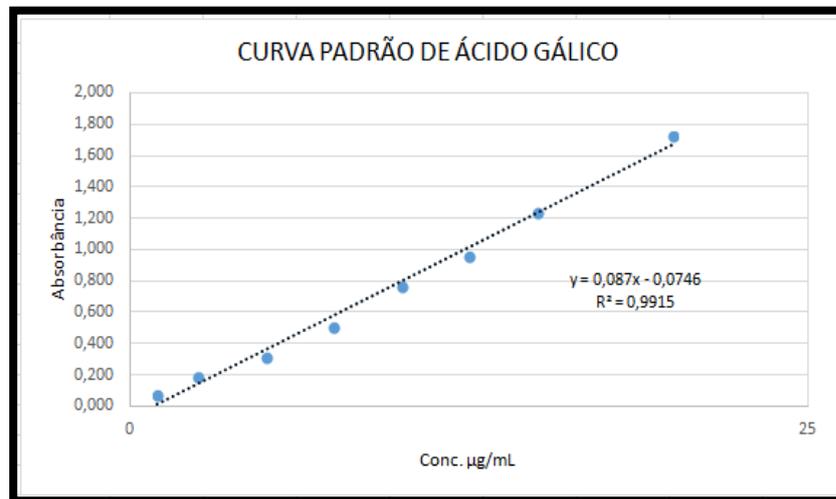
Amostra	Extrato (mg EAG.g^{-1})		
	Hexano	Etanol	Água
<i>Spirulina</i> biomassa cultivada	$14,41 \pm 0,00$	$13,62^a \pm 0,07$	$6,20^b \pm 0,10$
<i>Spirulina</i> biomassa comercial	n.d.	$12,84^a \pm 0,10$	$17,10^a \pm 0,09$

Média \pm desvio padrão. Nas colunas, as médias seguidas de letras iguais, não diferem significativamente. mg EAG.g^{-1} = miligrama de equivalente de ácido gálico por grama do extrato; SBH = *Spirulina* biomassa extrato hexano; SBE = *Spirulina* biomassa extrato etanol; SBA = *Spirulina* biomassa extrato água; SCH = *Spirulina* comercial extrato hexano; SCE = *Spirulina* comercial extrato etanol; SCA = *Spirulina* comercial extrato água; n.d.= não determinado.

Fonte: Dados da Pesquisa

Os valores médios de polifenóis obtidos por meio da equação da curva de calibração do ácido gálico $y = 0,087x - 0,0746$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9915$, e expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco.

Figura 1 - Ilustração gráfica da curva de Ácido Gálico.



Fonte: Dados da Pesquisa.

O teor de fenólicos para SBH foi de 14,41 mg EAG.g⁻¹, porém como não houve rendimento de extrato para a biomassa comercial (SCH) não foi possível determinar seu teor de fenólicos totais. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os teores de fenólicos totais para os extratos de etanol da SBE e SCE, mas para o extratos de água foi observado um maior teor de fenólicos para SBA (17,10 mg EAG.g⁻¹) diferindo significativamente da SBA (6,20 mg EAG.g⁻¹).

Comparando-se os resultados desta pesquisa com os resultados da pesquisa realizada por Kepekçi; Saygideger (2012) no extrato etanol, por meio de três etapas de extração há 40 µmol, 60 µmol e 120 µmol. Os resultados foram significativos para a extração de 60 e 120 µmol com valores respectivamente $(25,73 \pm 3,16)$ e $(49,83 \pm 5,56)$, demonstrando-se que os valores encontrados na tabela 1 referente à SBE e SCE mostram-se valores potencialmente significativos em relação aos compostos fenólicos da extração etanol. Os compostos fenólicos totais apresentam funções biológicas e em particular, são considerados como uma das mais importantes classes de antioxidantes naturais. Os resultados obtidos nesta pesquisa, comparando-se com os valores por Machu et al. (2015), a determinação dos compostos fenolicos totais por meio da extração água apresenta-se um valor numericamente baixo para as amostras SBA de $(6,20 \pm 0,10)$ e SCA $(17,10 \pm 0,09)$ em relação com a amostra da *Spirulina platensis* dos autores citados anteriormente com valor $(43,2 \pm 1,0)$. Por mais que os valores relativamente apresentados baixos da biomassa da *Spirulina platensis* e da

comercial. A água extrai com eficiência os compostos fenólicos com atividade antioxidante devido à sua polaridade, Os teores dos compostos fenólicos são significativamente encontrados nesta pesquisa.

Estão descritos na Tabela 2 a determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH presentes na biomassa da *Spirulina platensis* cultivada e da *Spirulina platensis* comercial.

Tabela 3- Determinação da atividade antioxidante pelo método de captura de radical livre DPPH ($\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$) das biomassas de *Spirulina platensis* cultivada e comercial para os extratos de hexano (SBH e SCH), etanol (SBE e SCE) e água (SBA e SCA) ao nível de probabilidade de $p < 0,05$.

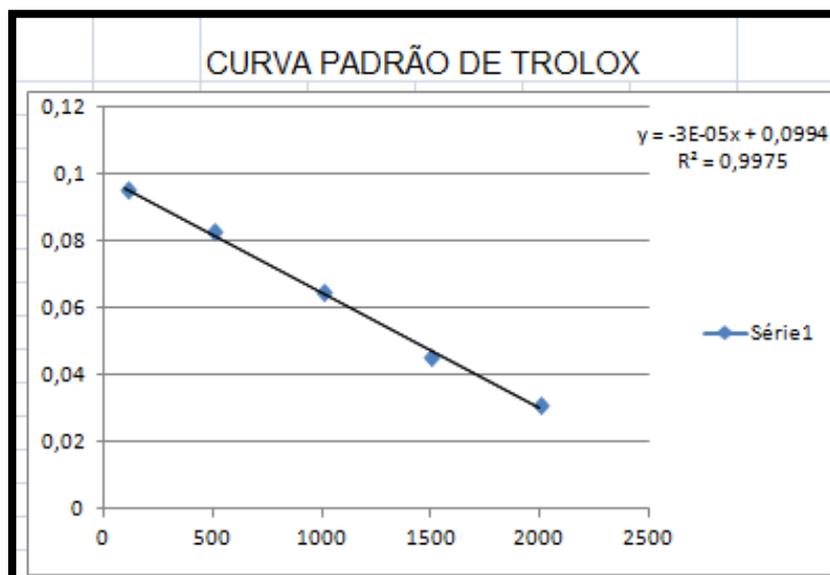
Amostra	Extrato ($\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$)		
	Hexano	Etanol	Água
<i>Spirulina</i> biomassa cultivada	64,43 \pm 1,28	113,37 ^a \pm 4,62	17,17 ^a \pm 3,39
<i>Spirulina</i> biomassa comercial	n.d.	46,03 ^b \pm 5,59	6,07 ^b \pm 1,28

Média \pm desvio padrão. Nas colunas, as médias seguidas de letras iguais, não diferem significativamente. $\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$ = micromol de equivalente de trolox por grama do extrato; SBH = *Spirulina* biomassa extrato hexano; SBE = *Spirulina* biomassa extrato etanol; SBA = *Spirulina* biomassa extrato água; SCH = *Spirulina* comercial extrato hexano; SCE = *Spirulina* comercial extrato etanol; SCA = *Spirulina* comercial extrato água; n.d.= não determinado.

Fonte: Dados da Pesquisa

Os valores médios obtidos por meio da equação da curva de trolox de calibração $y = 3\text{E-}05x + 0,0994$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9975$, e expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco.

Figura 2 - Ilustração gráfica da curva padrão de Trolox.



Fonte: Dados da Pesquisa.

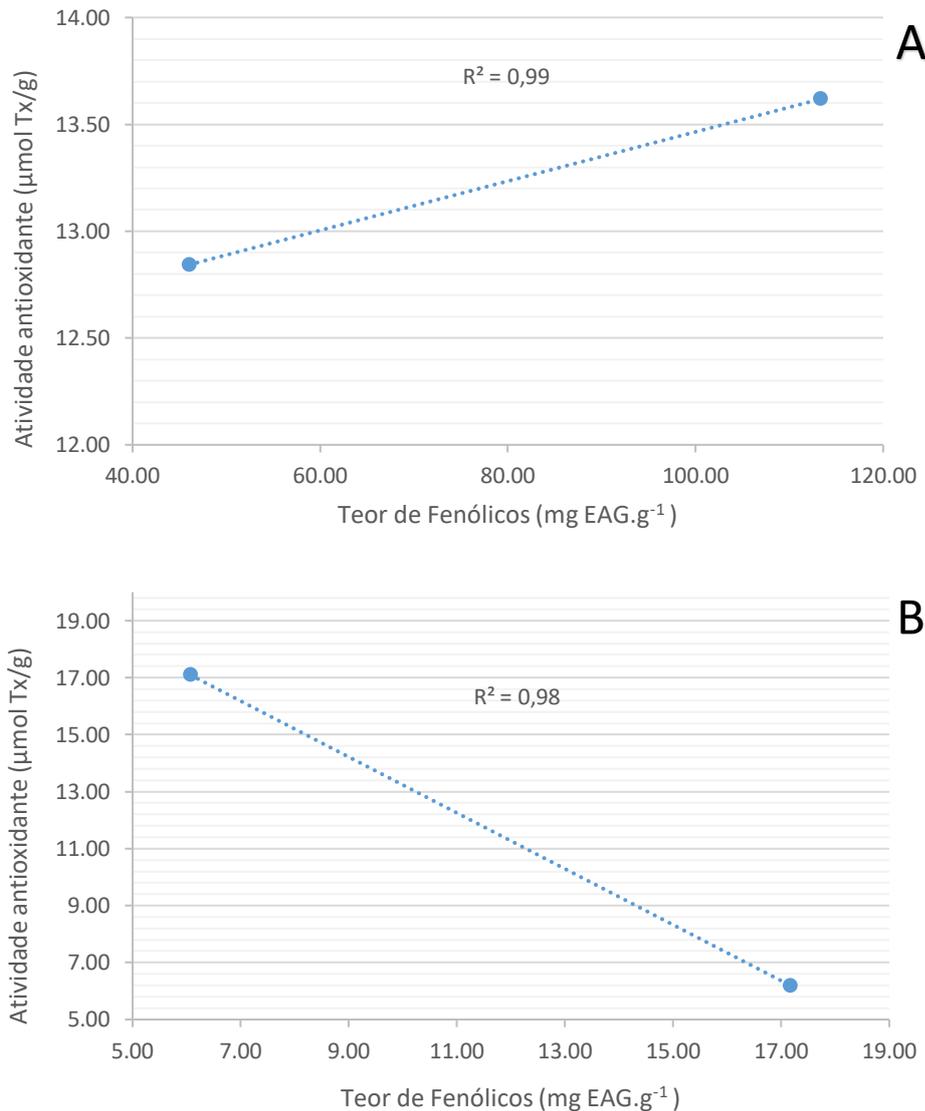
A atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH para SBH foi de 64,43 $\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$, não sendo determinado para SCH pois não houve rendimento de extrato. A atividade

antioxidante máxima foram observados nos dois extratos da biomassa cultivada SBE e SBA com valores de 113,37 e 17,17 $\mu\text{mol Tx.g}^{-1}$, respectivamente, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos seus correspondentes de biomassa comercial entre.

Para se obter uma grande variedade de extractos a partir da microalga *Spirulina platensis*, foram usados três solventes diferentes de acordo com a sua polaridade. Assim, uma grande variedade de extração pode ser obtida por meio da utilização de diferentes solventes. Em relação à atividade antioxidante dos extratos da *Spirulina platensis* biomassa hexano (SBH) e comercial (SCH), comparando-se com os resultados obtidos por Hajimahmoodi et al. (2010), podemos perceber valores numericamente significativos para os extratos SBH de (64,53) em relação as microalgas *Chlorella vulgaris* (4,06); *Chroococcus dispersus* (0,25) e *Anabaena Cylindrica* (0,15). Apresentando maior captura do radical livre DPPH para os extratos hexano da SBH. Portanto para a amostra SCH não atribui valores positivos para a extração hexano. Pelo fato de não obter rendimento durante a sua extração. Referente ao extrato etanol da SBE (113,37) e da SCE (46,03) encontra-se dentro dos padrões quando relacionados a valores numéricos de acordo com Herrero et al. (2004) que obteve um valor de (100,1) para extração etanol. Sendo assim, apresentando maiores capturas do radical livre DPPH para amostra SBE em relação à amostra SCE.

O coeficiente de correlação (R^2) entre a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico da biomassa de *Spirulina platensis* cultivada e comercial foi determinado (Figura 1). Observou-se uma elevada correlação entre a capacidade antioxidante de DPPH e os teor de fenólicos para os extratos de etanol ($R^2=0,99$) como demonstrado na Figura 1A, sendo o inverso observado para os extratos de água (Figura 1B).

Figura 3 - Ilustração gráfica da correlação entre as atividades antioxidantes dos extratos de etanol (Fig. 1A) e da água (Fig. 1B) e os teores de fenólicos totais nas biomassas de *Spirulina platensis* cultivada e comercial, ao nível de probabilidade de $p < 0,05$.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Assim, é possível inferir que os compostos fenólicos extraídos com o solvente etanol contribuíram para a capacidade antioxidante na microalga *Spirulina platensis*. Embora os compostos fenólicos tenham apresentando um relação positiva com a atividade antioxidante, é importante resaltar que essa microalga também produz uma grande variedade de outros compostos antioxidantes, incluindo, por exemplo, os carotenóides, ácidos gordos poli-insaturados e os polissacáridos, podendo ser estes outros compostos os responsáveis pela atividade antioxidante no extrato de água.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSSON, V.; MEIZOSO, I.; R.; TURNER, C. Determination of carotenoids in microalgae using supercritical fluid extraction and chromatography. *Journal of chromatography A*, n. 1250, p. 63-68, 2012.
- ANDRADE, M. R, COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. *Ciência e Agrotecnologia*, v.32, n.5, p. 1551-1556, 2008.
- BARCELLOS, A.; D.; BARRETO, A.; G.; S.; S.; MACHADO, B.; A.; S.; DRUZIAN, J.; I. Microalgas e seu potencial de uso. *Caderno de prospecção*. v. 5, n. 4, p. 178-184, 2012.
- BIERHALS, V. S., MACHADO, V.G., ECHEVENGUÁ, W.O., COSTA, A.V., FURLONG, E.B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.68, n.1, p.42-48, 2009.
- BILAD, M.; R.; ARAFT, H.; A.; NAHKELLECOM, I.; F.; J. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: A review. *Biotechnology advances*. v. 32, p. 1283-1300, 2014.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science & Technology*. 1995, 80, 25–30.
- CAMPO, J.; D.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, H.; VARGAS, M.; A.; RIVAS, J.; GUERREIRO, M.; G. Carotenoid content of chlorophycian microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* SP. (chlorophyta). *Journal of biotechnology*. v. 76, p. 51-59, 2000.
- CHATTEJEE, D.; BHATTACHARJESS, P. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich fraction from *Phormidium valderianum* optimization of experimental. *Algal research*. v. 3, p. 49-54, 2014.
- COLLA, L.M, REINEHR, C.O, REICHERT, C, COSTA, J.A.V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, v.98, n.16, p. 1489–1493, 2007.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*. v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.

GAD, A.; S.; KHADRAWY, Y.; EL-NEKEETY, Y.; A.; MOHAMED, S.; R.; HASSAN, N.; S.; WAHHAB, M.; A.; A. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *spirulina* in rats. *Nutrition*. v. 27, p. 582-589, 2011.

GORIS, K.; COLEN, V.; C.; WILCHES, I.; TAMARIZ, F.; L.; COOMAN, L.; D.; MUYLAERT, K. Impacto f nutrient stress on antioxidant produciont in thee species of microalgae. *Algl research*. v.7, p.5-57, 2015.

GUEDES, A.; C.; AMARO, H.; M.; GIÃO, M.; S.; MALCATA, F.; X. Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of and cyanobacteria. *Food chemistry*. v. 138, p. 638–643, 2013.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow green algae with chlorophyllid-c. freshwater microalga *Scenedesmus* sp. Under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol.* n.102, p.3098–3102, 2011.

IBRAHEM, M. D., IBRAHIM, M. A. The potential effects of *Spirulinaplatensis* (Arthrospiraplatensis) on tissue protection of Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) through estimation of P53 level. *Journal of advanced research*. v.5, n.1, p.133-136, 2013

LI, H.; B.; CHENE, R.; W.; WONG, C.; C.; FAN, K.; W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. v. 102, p. 771–776, 2007.

LIPING, L.; LI-AN, Q.; YIQUAN, W.; GUORONG, Y. *Spirulinaplatensis* extract supplementation attenuatesoxidative stress in acute exhaustive exercise:A pilot study. *International journal of the physical Sciences*,v.6, n. 12, p.2901-2906, 2011.

LÓPEZ, P.; P.; GARCÍA, S.; G.; JEFFERYYES, C.; AGATHOS, S.; N.; MUCHUGH, E.; WALSH, D.; MURRAY, P.; MOANE, S.; FEIJOO, G.; MORREIRA, M.; T. Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *Journal of cleaner production*. v. 64, p. 332 e 344, 2014.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, p.606, 2006. MARCO, G. J.; J. Am. Oil Soc. v. 45, n. 594, 1968.

MEIHUA, S., SHIULIAN, Z., DUODUO, Y. Protective effect of spirulina against cell DNA damage and oxidative stress induced by exhaustive exercise. Biomedical & pharmacology journal. v.6, n.2, p.125-131, 2013.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. Food chemistr. v. 85: p. 231-237, 2004.

Miller, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. Journal of the American oil chemists society. v.48, p.91-91, 1971.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinacao da atividade antioxidante e do teor de compostos fenolicos e flavonoides totais em amostras de polen apicola de Apis mellifera. Braz. Journal food technology. p.107-110, 2009.

OLIVEIRA, W.; C.; OLIVEIRA, C.; A.; GALVÃO, M.; E.; M.; C.; CASTRO, V.; C.; NASCIMENTO, A.; G. Cyanobacteria: a review of potential nutritional and biotechnological aspects. Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos. Biochemistry and biotechnology. v.2, n.1, p. 49-67, 2013.

PEIRETTI, P. G. Effects of diets with increasing levels of *Spirulina platensis* on the carcass characteristics, meat quality and fatty acid composition of growing rabbits. Livestock science. v. 140, n. 1-3, p. 218-224, 2011.

Pulido, R.; Bravo, L.; Fulgencio, S.-C. Antioxidant activity of dietary polyphenols As determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 3396–3402

RAPOSO, M.; F.; J.; MORAIS, A.; M.; M.; B. Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. Life sciences. v. 119, p. 3-10, 2014.

RAVI, M., DE, S. L., AZHARUDDIN, S., PAUL, S. F. D. The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. Nutrition and dietary supplements. v. 2, p.73-83, 2010.

RAWAT, I.; KUMAR, K.; MUTANDA, T.; BUX, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied energy*. v. 103, p. 444–467, 2013.

RODRIGUES, D.; B.; FLORES, E.; M.; M.; BARIN, J.; S.; MERCADANTE, A.; Z.; LOPEZ, E.; J.; ZEPKA, L.; Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food research international*. v. 65, p. 144–148, 2014.

Rufino, M.D.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; Mancini-Filho, J. Bioactive Compounds and antioxidant capacities of 18 non-tradicional tropical fruits from Brazil. *Food chemistr*. v.121, p.996–1002. 2010.

SILVA, L. A. Estudo do Processo Biotecnologico de Producao, Extracao e Recuperacao do Pigmento Ficocianina da *Spirulina platensis*. Curitiba, 90 p., 2008.

SILVA, L. A. Estudo do processo biotecnologico de producao, extracao e recuperacao do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis*. 2008. 87 f. Dissertacao (Mestrado em Engenharia Quimica) Programa de Pos-Graduacao em Processos Biotecnologicos, Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2008.

SKORUPSKAITE, V.; MAKAREVICIENE, V.; LEVISAUSKAS, D. Optimization of mixotrophic cultivation of microalgae *Chlorella* sp. For biofuel production using response surface methodology. *Algal Research*. v. 7, p. 45–50, 2014.

Slinkard, K.; Singleton, V.L. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. ***American Journal of Enology and Viticulture***. v.28, p.49–55, 1977.

STEIN, J.R. Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements. In: *Handbook of phycological methods*. Cambridge University Press. p. 448, 1973.

VILCHEZ,C.; GARHAYO, I.; LOBATO, M.; V.; VEJA, J.; M. Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal. *Enzyme microb. technol*. v. 20, 1997.

WALNE, P. R. Studies on the food values of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. Invest. Ser. II, v. 5, n. 26, p. 62, 1970.

WANG, L, PAN, B., SHENG, J., XU, J., HU, Q. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. Food chemistry. v. 105, n.1, p. 36-41, 2007.

Yingying, g.; s.; Hui, w.; Ganlin, g.; Yinfang, p.; Binlun, y. The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. Carbohydrate polymers. v. 113 p. 22–3, 2014.

ZARROUK, C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler. 1966. Theises (Ph. D.) - Faculty of science. Universite des Paris, Paris, 1966.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie. Food science and technology. v. 28, p. 25-3, 1995.