



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

HUDSON DAMASCENO MAIA

POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DA MICROALGA

Arthrospira platensis

FORTALEZA

2018

HUDSON DAMASCENO MAIA

POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DA MICROALGA

Arthrospira platensis

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvana Saker-Sampaio

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M186p Maia, Hudson Damasceno.
Potencial bioativo de extratos da microalga *Arthrospira platensis* / Hudson Damasceno Maia. – 2018.
85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Silvana Saker Sampaio.

1. Spirulina. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade anticâncer. I. Título.

CDD 664

POTENCIAL BIOATIVO DE EXTRATOS DA MICROALGA

Arthrospira platensis

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca

Aprovada em 23 / 08 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Silvana Saker Sampaio (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª Dr^ª Márcia Barbosa de Sousa

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof^ª Dr^ª Elisabeth Mary Cunha da Silva

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Sebastião Biserra Maia e
Cláudia Maria Damasceno Maia.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª Dr^ª Silvana Saker Sampaio (orientadora), pelos ensinamentos, pelo exemplo de dedicação e amor ao que se faz, por todo apoio e paciência durante o percurso da Pós-Graduação.

A Prof^ª Dr^ª Márcia Barbosa de Sousa, pela contribuição com as análises de composição química (dados não apresentados).

Aos membros da banca examinadora, Prof^ª Dr^ª Márcia Barbosa de Sousa e Prof^ª Dr^ª Elisabeth Mary Cunha da Silva, pelas valiosas colaborações e sugestões e por todo aprendizado que eu obtive trabalhando com elas.

A Prof^ª Dr^ª Oscarina Viana de Sousa, Dr^ª Fátima Cristiane Teles de Carvalho e Jade Oliveira Abreu pela ajuda na execução das análises microbiológicas e por todo o aprendizado fornecido.

Aos amigos Giancarlo Lavor, Danilo Cavalcante e Nadine Salgueiro pela ajuda prestada na realização do trabalho.

Aos amigos Beatriz Emilly Alves Rebouças, Thalyanne Mendes Paula, Karolina Costa de Sousa pelo apoio, companheirismo e amizade durante o período do Mestrado.

Aos amigos Vládila Oliveira, Eliak Lima, Lia Reck, Lília Freitas, Juliana Vanessa, Daniel Borges, Sara Andrade, Alexandra Sampaio, Júnior Sousa, Rebeca Laranjeira, Thamiris Paiva e a todos os amigos da UFC que fizeram esse período da Pós-Graduação valer ainda mais a pena.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da Engenharia de Pesca da UFC pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, Dr. Luiz Gonzaga do Nascimento Neto e Renally Barbosa da Silva pela contribuição com as análises anticâncer.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da concessão e manutenção da bolsa de auxílio.

Aos meus pais pelo suporte, paciência e incentivo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, *in memoriam*, por ter me dado a primeira oportunidade de participar das atividades de um laboratório na iniciação científica. Por suas valiosas instruções, pelo acompanhamento e pela orientação durante quase a totalidade do período da minha graduação em Engenharia de Pesca, pelo companheirismo e pelo exemplo de pessoa ética, responsável e que amava e se dedicava sem medir esforços ao que fazia. Os ensinamentos adquiridos com o estimado Prof. Wladimir, e a paixão que desenvolvi pelas microalgas, fisiologia, imunologia e temas relacionados foram determinantes para a confecção do presente trabalho e certamente me influenciarão nas minhas atividades profissionais.

Muito obrigado por tudo!

RESUMO

As pesquisas sobre novas fontes de produtos naturais encontraram nas microalgas fontes alternativas de metabólitos com propriedades biológicas e bioquímicas notáveis devido a diversidade de suas moléculas e estruturas químicas complexas. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial biológico dos extratos da cianobactéria *Arthrospira platensis*, comumente conhecida como Spirulina. Para isso, quatro extratos foram preparados com solventes de polaridade crescente (hexano – Hx, acetato de etila – AcOEt, metanol – MeOH e metanol:água 1:1 – MeOH:H₂O 1:1) e avaliados especificamente quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), ao teor de flavonoides (TF), quanto às atividades antioxidante *in vitro*, medidas pela capacidade de sequestro do radical DPPH, capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC), poder de redução de íons férricos (FRAP) e atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB). A concentração inibitória mínima (CIM), determinada pela técnica padrão de microdiluição, foi testada frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* ser. Braenderup. A atividade antifúngica, determinada pela técnica da difusão em disco, foi testada frente ao fungo filamentoso *Aspergillus niger* e à levedura *Candida albicans*. A atividade antibiofilme, determinada pela técnica da aderência em microplacas de poliestireno, foi testada frente à cepa *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade anticâncer foi determinada pela investigação do efeito dos extratos de *A. platensis* sobre a viabilidade celular das linhagens MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e LNCaP clone FGC (carcinoma de próstata metastático). Os valores de CFT (mg EAG g⁻¹ dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O 1:1) foram, respectivamente, 73,34; 99,0; 30,49 e 26,21. Os valores de TF (mg EQ g⁻¹ dos extratos Hx, AcOEt e MeOH) foram 318,15; 474,65 e 73,05, respectivamente. As atividades antioxidantes *in vitro*, medidas pelo DPPH, FIC e BCB foram mais elevadas no extrato AcOEt, enquanto que o FRAP foi maior no extrato MeOH:H₂O (1:1). Nenhum extrato apresentou atividade antimicrobiana (CIM) contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* ser. Braenderup, porém foi observada uma atividade bacteriostática do extrato Hx frente à cepa *S. aureus* na concentração de 1.000 µg mL⁻¹. Não foi observada inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa* por nenhum dos extratos testados. Não foi possível evidenciar atividade antifúngica contra *C. albicans*, porém foi observada uma ação fungistática contra *A. niger* causada pelo extrato AcEot na concentração de 500 µg mL⁻¹. A viabilidade celular da linhagem LNCaP foi de 71,11%, 35,08% e 61,48% para os extratos Hx, AcOEt e MeOH, respectivamente, enquanto que para as células da linhagem MCF-7, ela foi de 67,29%, 86,56% e 60,98% para os extratos Hx, AcOEt e MeOH, respectivamente. Os extratos

brutos da microalga *A. platensis* apresentaram elevados teores de compostos fenólicos e flavonoides, podendo ser considerados uma fonte natural desses antioxidantes. Os extratos brutos não apresentaram forte atividade antimicrobiana. Os extratos da *A. platensis* são uma fonte promissora para a produção de fármacos para o controle do crescimento das linhagens das células cancerígenas MCF7 e LNCaP. São necessários novos estudos para a identificação dos compostos bioativos presentes nos extratos de *A. platensis*, especialmente no extrato AcOEt.

Palavras-chave: Spirulina. Atividade antioxidante. Atividade anticâncer.

ABSTRACT

Research on new sources of natural products found in microalgae alternative sources of metabolites with remarkable biological and biochemical properties due to the diversity of their molecules and complex chemical structures. The present work had as objective to study the biological potential of the extracts of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*, commonly known as Spirulina. For this, four extracts were prepared with increasing polarity solvents (hexane – Hx, ethyl acetate – AcOEt, methanol – MeOH, and methanol:water 1:1 – MeOH:H₂O 1:1) and evaluated specifically for the content of total phenolic compounds (TPC), the flavonoid (flavonols and flavones of luteolin subgroup) quantification (FC), and the *in vitro* antioxidant activities, measured by the DPPH radical scavenging activity, ferrous ion-chelating ability (FIC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and β -carotene bleaching (BCB) inhibitory activity. The minimum inhibitory concentration (MIC), performed by standard microdilution technique, was tested against the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* ser. Braenderup. The antifungal activity, performed by the disc diffusion technique, was tested against the filamentous fungus *Aspergillus niger* and the yeast *Candida albicans*. The antibiofilm activity, determined by the adhesion technique in polystyrene microplates, was performed against the strain *Pseudomonas aeruginosa*. The anticancer activity was investigated by the effect of extracts of *A. platensis* on the cell viability of MCF-7 (breast adenocarcinoma) and LNCaP clone FGC (metastatic prostate carcinoma). The CFT values (mg EAG g⁻¹ extracts Hx, AcOEt, MeOH and MeOH: H₂O 1:1) were 73.34, 99.00, 30.49 and 26.21, respectively. The FC values (mg EQ g⁻¹ extract Hx, AcOEt and MeOH) were 318.15, 474.65 and 73.05, respectively. *In vitro* antioxidant activities measured by DPPH, FIC and BCB were higher in the AcOEt extract, whereas FRAP was higher in the MeOH:H₂O (1:1) extract. No extract showed antimicrobial activity in MIC against *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella* ser. Braenderup, but a bacteriostatic activity of the Hx extract was observed against the *S. aureus* strain at the concentration of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. No inhibition of *P. aeruginosa* biofilm formation was observed for any of the extracts tested. It was not possible to observe antifungal activity against *C. albicans*, but it was observed a fungistatic activity against *A. niger* caused by the AcEOt extract at the concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The cell viability of the LNCaP line was 71.11%, 35.08% and 61.48% for the extracts Hx, AcOEt and MeOH, respectively, whereas for MCF-7 cells, it was 67.29%, 86.56% and 60.98% for extracts Hx, AcOEt and MeOH, respectively. The crude extracts of the *A. platensis* microalga presented high levels of phenolic and flavonoids compounds, being considered a natural source of these antioxidants. The crude extracts did not

show strong antimicrobial activity. The extracts of *A. platensis* are a promising source for the production of drugs for the control of the growth of MCF7 and LNCaP cancer cell lines. Further studies are needed to identify the bioactive compounds present in extracts of *A. platensis*, especially in the AcOEt extract.

Keywords: Spirulina. Antioxidant activity. Anticancer activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Sistema de produção da microalga <i>Arthrospira platensis</i> na Estação de Aquicultura Prof. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.....	32
Figura 2 –	Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100, 250, 500 e 1.000 µg mL ⁻¹ , frente a cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).....	58
Figura 3 –	Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100, 250, 500 e 1.000 µg mL ⁻¹ , frente a cepa <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922).....	58
Figura 4 –	Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100, 250, 500 e 1.000 µg mL ⁻¹ , frente a cepa <i>Salmonella</i> ser. Braenderup (LAMAP18).....	59
Figura 5 –	Verificação da atividade bacteriostática dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100 e 1.000 µg mL ⁻¹ (A). Verificação da atividade bacteriostática do extrato hexano (Hx) na concentração 1.000 µg mL ⁻¹ frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) na concentração 100 µg mL ⁻¹ (B).....	60
Figura 6 –	Verificação da atividade antifúngica dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1), em duplicata, da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100 e 500 µg mL ⁻¹ , frente ao fungo <i>Aspergillus niger</i>	61
Figura 7 –	Verificação da atividade antifúngica dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1), em duplicata, da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100 e 500 µg mL ⁻¹ , frente ao fungo <i>Candida albicans</i>	61

Figura 8 – Verificação da atividade antibiofilme dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 e 1.000 µg mL⁻¹ frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)..... 63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Rendimento das extrações da biomassa da microalga <i>Arthrospira platensis</i> com os solventes hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1), em ordem crescente de polaridade.....	44
Gráfico 2 –	Curva padrão do ácido gálico (G7384 Sigma) em concentrações de 8,51 a 170,12 µg mL ⁻¹	46
Gráfico 3 –	Curva padrão da quercetina (33.795-1 Aldrich) em concentrações de 10 a 150 µg mL ⁻¹	47
Gráfico 4 –	Capacidade de sequestro do DPPH do ácido ascórbico (AA, controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações de 100 a 1.000 µg mL ⁻¹	49
Gráfico 5 –	Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC) do EDTA (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100 a 1.000 µg mL ⁻¹	52
Gráfico 6 –	Poder de redução de íons férricos (FRAP) do ácido ascórbico (AA, controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 25 a 1.000 µg mL ⁻¹	53
Gráfico 7 –	Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB) (média ± desvio padrão) do ácido ascórbico (AA, controle positivo) e dos dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações de 5 a 1.000 µg mL ⁻¹ , após 300 minutos.....	55
Gráfico 8 –	Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB) (média ± desvio padrão), de 0 a 300 min, medidas a cada 30 minutos, do ácido ascórbico (controle positivo - A) e dos extratos hexano (Hx - B), acetato de etila (AcOEt - C), metanol (MeOH - D) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1 - E) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações de 5 a 1.000 µg mL ⁻¹	56

Gráfico 9 –	Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com várias concentrações (0,2 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato hexano (Hx) da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	64
Gráfico 10 -	Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com várias concentrações (0,2 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato acetato de etila (AcOEt) da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	65
Gráfico 11 -	Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com várias concentrações (0,2 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato metanol (MeOH) da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Compostos fenólicos totais (CFT), expressos em mg de equivalente ácido gálico (EAG) por g dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	46
Tabela 2 –	Teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF), expressos em mg de equivalente quercetina (EQ) por g dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	48
Tabela 3 –	Capacidade de sequestro do DPPH do ácido ascórbico (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações de 100 a 1.000 µg mL ⁻¹	49
Tabela 4 –	Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC) do EDTA (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 10 a 1.000 µg mL ⁻¹	52
Tabela 5 –	Poder de redução de íons férricos (FRAP) do ácido ascórbico (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 25 a 1.000 µg mL ⁻¹	53
Tabela 6 –	Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB) (média ± desvio padrão) do ácido ascórbico (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações de 5 a 1.000 µg mL ⁻¹ , após 300 minutos.....	54
Tabela 7 –	Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com os extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> na concentração de 200 µg mL ⁻¹	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) nos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100 a 1.000 µg mL ⁻¹	39
Quadro 2 –	Determinação da atividade antibiofilme nos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H ₂ O 1:1) da microalga <i>Arthrospira platensis</i> , nas concentrações 100 e 1.000 µg mL ⁻¹	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	<i>Arthrospira platensis</i>	22
2.2	Compostos fenólicos e flavonoides.....	24
2.3	Atividades biológicas da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	26
2.3.1	<i>Atividade antioxidante</i>	26
2.3.2	<i>Atividade antimicrobiana</i>	28
2.3.3	<i>Atividade anticâncer</i>	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Cultivo da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	32
3.2	Coleta e liofilização da biomassa da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	33
3.3	Preparação dos extratos da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	33
3.4	Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	34
3.5	Quantificação do teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF) nos extratos da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	35
3.6	Atividades antioxidantes <i>in vitro</i> nos extratos da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	35
3.6.1	<i>Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)</i>	35
3.6.2	<i>Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC)</i>	36
3.6.3	<i>Poder de redução de íons férricos (FRAP)</i>	37
3.6.4	<i>Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB)</i>	37
3.7	Análises microbiológicas.....	38
3.7.1	<i>Concentração inibitória mínima (CIM)</i>	38
3.7.2	<i>Atividade antifúngica</i>	39
3.7.3	<i>Atividade antibiofilme</i>	40
3.8	Atividade contra células de câncer.....	41
3.8.1	<i>Linhagens celulares e condições de cultivo das células de câncer</i>	41
3.8.2	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43

4.1	Condições de cultivo da microalga <i>Arthrospira platensis</i> e rendimentos das extrações.....	43
4.2	Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	45
4.3	Quantificação do teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF) nos extratos da microalga <i>Arthrospira platensis</i>	47
4.4	Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)...	49
4.5	Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC).....	51
4.6	Poder de redução de íons férricos (FRAP).....	53
4.7	Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB).....	54
4.8	Concentração inibitória mínima (CIM).....	57
4.9	Atividade antifúngica.....	60
4.10	Atividade antibiofilme.....	62
4.11	Atividade contra células de câncer.....	64
4.11.1	<i>Efeito dos extratos da microalga Arthrospira platensis sobre a viabilidade celular</i>	64
5	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que apresentam clorofilas *a* e *c*, além de outros pigmentos e formam a base da cadeia trófica. Elas apresentam diversas aplicações, por exemplo, na alimentação humana e animal, composição de fármacos e cosméticos, tratamento de águas residuais, produção de biocombustíveis (LEE; HAN, 2015). Ademais, as microalgas não precisam competir com as culturas agrícolas para produção de alimentos, pois podem ser cultivadas em terras não aráveis (MOHAN *et al.*, 2015), e ainda apresentam rápido crescimento e elevado rendimento por unidade de área (ZENG *et al.*, 2015). As microalgas podem ser cultivadas utilizando-se nutrientes presentes em águas residuárias (CHIU *et al.*, 2015), inclusive efluente da aquicultura, reduzindo, dessa forma, a carga de nitrogênio e fósforo e proporcionando o tratamento biológico do efluente residuário (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

A seleção da espécie de microalga a ser cultivada deve levar em consideração o crescimento rápido nas condições de cultivo em que a microalga será produzida (sem perda das suas características nutricionais), ser facilmente separada da água por filtração, além de tolerar alterações nos parâmetros físico-químicos como salinidade e temperatura e possuir valor comercial (SILVA, 2013).

As microalgas são consideradas como fontes de cepas robustas e reprodutíveis para produzir diferentes produtos antioxidantes e fenólicos (MOROWVAT; GHASEMI, 2016).

Muitos fatores podem causar mudanças na composição química e nutricional das microalgas, como, a origem geográfica ou área de cultivo, época de cultivo, temperatura e salinidade, métodos de processamento, extração e armazenamento (LORDAN; ROSS; STANTON, 2011), revelando a grande plasticidade desses micro-organismos e a sensibilidade das espécies bioativas produzidas nas condições que lhes são dadas.

As microalgas podem ser cultivadas sob condições distintas com relação à radiação solar, exposição a metais traços, concentrações de oxigênio, temperatura, pH, que podem levar à formação de radicais livres e/ou espécies reativas (GUPTA; ABU-GHANNAM, 2011). Quando em elevadas concentrações, estes agentes oxidantes podem atacar e danificar os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, levando a uma disfunção metabólica permanente e, conseqüentemente, à morte da célula (HAMED *et al.*, 2017; PANDEY *et al.*, 2015; SABATINI *et al.*, 2009). Os danos causados pelos radicais livres e/ou espécies reativas são minimizados por meio do sistema de defesa antioxidante (HAMED *et al.*, 2017; OLIVARES *et al.*, 2016), o qual pode incluir mecanismos enzimáticos (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase,

catalase) e não-enzimáticos (carotenoides, compostos fenólicos, polissacarídeos sulfatados, vitaminas, glutatona), conhecidos por protegerem plantas, macro e microalgas dos danos causados por agentes oxidantes (CORNISH; GARBARY, 2010; CHOUDHARY *et al.*, 2007; HAMED *et al.*, 2017; MACHADO; SOARES, 2016; SÁEZ *et al.*, 2015; TRIPATHI; GAUR, 2004).

Os antioxidantes naturais, como os produzidos pelas microalgas, são geralmente mais adequados para o consumo humano do que os sintéticos, por exemplo, o hidroxibutiltolueno (BHT) e o hidroxibutilanisol (BHA), os quais podem apresentar efeito carcinogênico e/ou tóxico, causando complicações renais (LAGANÀ *et al.*, 2017).

Existe um interesse mundial crescente em encontrar novos antioxidantes, seguros e poderosos a partir de fontes naturais, a fim de minimizar danos oxidativos às células e prevenir a deterioração oxidativa em alimentos, produtos farmacêuticos ou cosméticos (MAADANE *et al.*, 2015). Os compostos antioxidantes exercem sua ação por meio de diferentes mecanismos, incluindo a quelatação de catalisadores de íons de metais de transição, a decomposição de peroxidases, a prevenção da extração contínua de hidrogênio e a eliminação de radicais livres (VALKO *et al.*, 2006). A atividade antioxidante normalmente se refere à habilidade de eliminar radicais livres (BREWER, 2011).

Da mesma forma, há uma busca por novos agentes quimioterápicos e antimicrobianos. Atualmente, o método mais efetivo para tratar tumores malignos é a quimioterapia (JABEEN *et al.*, 2017). Entretanto, as técnicas quimioterápicas são limitadas pela alta toxicidade celular, assim como pela ocorrência de efeitos colaterais (AMEN *et al.*, 2016). Portanto, tratamentos biológicos seletivos têm surgido para tratar certos tipos de cânceres ou para marcar determinantes específicos expressos por muitos tumores diferentes (SCOTT; ALLISON, WOLCHOK, 2012). Extratos de microalgas têm mostrado inibição do crescimento de células cancerígenas *in vivo* e *in vitro* sem afetar as células saudáveis (JABEEN *et al.*, 2017; TALERO *et al.*, 2015).

Os biofilmes, reconhecidas comunidades microbianas envoltas em uma matriz extracelular, exibem uma estrutura característica e elevada resistência a compostos antimicrobianos e estresse ambiental (MULCAHY; CHARRON-MAZENOD; LEWENZA, 2008). Os biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, conferem uma resistência ou tolerância aos antibióticos da ordem de até mil vezes mais do que sua forma planctônica, sendo necessário dirimir ou destruir o biofilme, para que as bactérias se tornem mais suscetíveis aos antimicrobianos (AARON *et al.*, 2002).

A necessidade por novos agentes antifúngicos também é inegável. Na prática médica, os agentes antifúngicos mais utilizados não são completamente eficazes devido ao desenvolvimento de resistência dos fungos, toxicidade do hospedeiro e efeitos colaterais indesejáveis que limitam seu uso (CAMPOY; ADRIO, 2017).

As pesquisas sobre novas fontes de produtos naturais encontraram nos organismos que habitam o ambiente aquático (bactérias, algas, briozoários, cnidários, equinodermos, moluscos, esponjas, tunicados e outros), fontes alternativas de metabólitos com propriedades biológicas e bioquímicas notáveis devido a diversidade de suas moléculas e estruturas químicas complexas e difíceis de serem sintetizadas quimicamente (ÁLVAREZ-GÓMEZ; KORBEE; FIGUEROA, 2016; TIAN; LI; ZHAO, 2017).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial biológico dos extratos da cianobactéria *Arthrospira platensis*, comumente conhecida como Spirulina. Para isso, os extratos preparados com solventes de polaridades diferentes foram avaliados especificamente quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, ao teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) e quanto às atividades antioxidante *in vitro*, antibacteriana (concentração inibitória mínima), antifúngica, antibiofilme e anticâncer.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As microalgas são uma coleção diversa de micro-organismos que produzem oxigênio por meio da fotossíntese. Elas não pertencem a um único grupo monofilético, o que dificulta a sua definição (RICHMOND; HU, 2013).

Estes micro-organismos fotossintetizantes podem crescer rapidamente utilizando-se da energia solar e de compostos inorgânicos como dióxido de carbono, nitrogênio e fósforo (GRIMA *et al.*, 2003). As microalgas normalmente apresentam uma eficiência na conversão da energia solar em bioenergia cerca de dez vezes superior a das plantas terrestres por unidade de área (AMARO; MACEDO; MALCATA, 2012; HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012), devido ao crescimento ocorrer em meio aquoso (ZHAO; MA; LIU, 2018).

Uma variedade de microalgas procariotas (cianobactérias) e eucariotas tem sido identificada como candidatas promissoras para a produção de materiais úteis, como compostos químicos e biocombustíveis, alguns dos quais são comercialmente viáveis (MAEDA *et al.*, 2018). Não é apenas a presença de um determinado composto em particular que torna esses micro-organismos interessantes, mas também sua enorme diversidade, e a possibilidade de não apenas produzi-los, mas também de cultivá-los em diferentes condições, levando a um aumento na produção de alguns compostos bioativos (PLAZA *et al.*, 2010). As microalgas podem se adaptar rapidamente às mudanças nas condições de cultivo quanto à variação de salinidade, temperatura, nutrientes e irradiação (MOBIN; ALAM, 2017), variando suas características químicas de acordo com fatores como as condições e tempo de cultivo, método de extração, mesmo que a aparência delas seja similar (WAN; WU; KUČA, 2016).

Assim sendo, as microalgas podem produzir uma grande variedade de metabólitos secundários (biologicamente ativos) com estruturas singulares e atividades biológicas que geralmente não são encontrados em outros organismos (ANBUCHZHIAN; KARUPPIAH; LI, 2015; HERRERO *et al.*, 2013; MOBIN; ALAM, 2017).

O sistema de cultivo precisa ser escolhido para cada cepa de microalga considerando algumas características básicas como iluminação, circulação e trocas gasosas (suprimento de gás carbônico, eliminação de oxigênio) (MASOJÍDEK; TORZILLO, 2014).

Basicamente, são empregadas duas formas de produção de biomassa de microalgas em massa: (1) Tanques abertos ao ar livre, ou seja, reservatórios abertos que apresentam uma área de cultivo relativamente grande; e (2) Fotobiorreatores, onde o cultivo acontece em recipientes fechados ou semifechados, com luz natural ou artificial (MASOJÍDEK; TORZILLO, 2014; SHIN *et al.*, 2018).

Os sistemas de produção ao ar livre podem ser limitados por uma série de parâmetros, como, por exemplo, intensidade luminosa, pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, predação, os quais contribuem significativamente para o sucesso do cultivo e devem ser monitorados continuamente. Contudo, esses sistemas de produção apresentam um menor custo de implantação e de operação, sendo mais duráveis e apresentando uma maior capacidade de produção quando comparado com fotobiorreatores mais sofisticados (MASOJÍDEK; TORZILLO, 2014). Nesse sistema, apenas um número limitado de espécies de microalgas é adequado para ser cultivado por tolerarem um ambiente de cultivo severo. Os exemplos clássicos são: *Dunaliella* em salinidade elevada, *Arthrospira* em alcalinidade elevada e *Chlorella* em concentração de nutrientes elevada (HARUN *et al.*, 2010).

Os fotobiorreatores apresentam um menor risco de contaminação, maior facilidade de manutenção das condições do cultivo, redução da perda de água por evaporação e facilidade de suprir a demanda de CO₂ em relação aos tanques abertos (LIAO *et al.*, 2014).

2.1 *Arthrospira platensis*

A microalga *Arthrospira platensis* é um organismo fotossintético, filamentoso, com formato espiralado, multicelular, com coloração verde-azulada. Como este micro-organismo contém clorofila *a*, do mesmo modo que os vegetais superiores, os botânicos o classificam como microalga pertencente à Classe Cyanophyceae. Mas, de acordo com os bacteriologistas, ele é classificado como bactéria (cianobactéria), devido a sua estrutura procariótica (KORU, 2012).

A classificação taxonômica dessa microalga tem sido bastante estudada e ainda há indefinições apesar dos contínuos avanços resultantes das análises moleculares. Parece claro que os gêneros *Arthrospira* e *Spirulina* são diferentes, tomando como base os aspectos morfológicos e os critérios moleculares (SILI; TORZILLO; VONSHAK, 2012). Divergências à parte, de acordo com o AlgaeBase (2018), o gênero *Arthrospira* tem 24 espécies taxonomicamente aceitas. A classificação taxonômica da microalga *A. platensis* Gomont está apresentada abaixo.

Domínio Prokaryota

Reino Eubacteria

Subreino Negibacteria

Filo Cyanobacteria

Classe Cyanophyceae

Subclasse Oscillatoriophyceae

Ordem Oscillatoriales

Família Microcoleaceae

Gênero *Arthrospira*Espécie *A. platensis*

Segundo a FAO (2016), os valores de produção global das Spirulinas cultivadas nos anos de 2005, 2010, 2013 e 2014 foram da ordem de 48 mil, 97 mil, 82 mil e 86 mil toneladas, respectivamente. A própria FAO reconhece que a produção de microalgas corresponde a uma pequena parcela da aquicultura mundial e admite que os dados contabilizam apenas uma fração da produção real no mundo e, portanto, estão significativamente subestimados. Na verdade, as Spirulinas e outras microalgas são produzidas em larga escala há muitos anos em países como Austrália, Índia, Israel, Japão, Malásia e Mianmar, sem que os dados de produção sejam reportados a FAO.

A. platensis é rica em proteínas e aminoácidos essenciais, vitaminas C e E e provitamina A, minerais como ferro, cálcio, cromo, cobre, magnésio, manganês, fósforo, potássio, sódio e zinco, ácidos graxos essenciais como ácido gama-linolênico e pigmentos como clorofila *a*, ficocianina e carotenoides (SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017).

A parede celular é composta pelo peptidoglicano, por vezes denominado mureína, que consiste em um heteropolissacarídeo ligado a peptídeos presentes na parede celular de procariontes que, diferentemente da celulose, é facilmente digerido pelas enzimas digestivas dos animais e, após um período de 18 h, mais de 85% do conteúdo proteico da *A. platensis* pode ser digerido e assimilado (WAN; WU; KUČA, 2016).

Na parede celular de *A. platensis* também são encontrados lipopolissacarídeos e, no citoplasma, há presença de polissacarídeos sulfatados com ação imunomoduladora já demonstrada em mamíferos e peixes (CHEN *et al.*, 2014; HIRAHASHI *et al.*, 2002; WATANUKI *et al.*, 2006), somando-se ao aumento da imunidade inata e da resistência contra infecções causadas pela bactéria *Vibrio alginolyticus* em camarão *Penaeus vannamei* (CHEN *et al.*, 2016; TAYAG *et al.*, 2010).

Geralmente, *A. platensis* apresenta de 55% a 70% de proteína, de 15% a 25% de polissacarídeos, de 6% a 13% de ácidos nucleicos, de 5% a 6% de lipídio e de 2,2% a 4% de minerais (HOSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013). A composição química média da *A. platensis*, produzida pela empresa australiana Swiss Wellness Pty Ltd. (Melbourne, Austrália), consistiu em 63,60% proteína, 6,38% gordura, 17,51% carboidrato, 7,03% cinza e 5,48% umidade. (ALAVI; GOLMAKANI, 2017). Batista *et al.* (2017) determinaram a composição centesimal de *A. platensis* F & M-C256, originária da empresa italiana Archimede

Ricerche S.r.l. (Camporosso, Imperia, Itália), tendo encontrado $68,9 \pm 1,0\%$ de proteína, $12,8 \pm 0,2\%$ de carboidrato, $10,7 \pm 0,6\%$ de lipídio e $6,1 \pm 0,1\%$ de cinza. Essa e outras três espécies de microalgas foram incorporadas na formulação de biscoitos, os quais exibiram características potenciais para se tornarem apreciados e consumidos como alimentos funcionais no futuro.

A. platensis apresenta uma ampla variedade de pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a*, β -caroteno, luteína, ficocianina e aloficocianina, os quais são compostos bioativos que têm sido utilizados como corante natural em alimentos e cosméticos e como produto farmacêutico para o consumo animal e humano (CHEN *et al.*, 2016; SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017). Além disso, *A. platensis* apresenta propriedades que podem inibir a replicação viral, o desenvolvimento de câncer e ainda aumentar a produção de anticorpos (BELAY, 2002; KHAFAGA; EL-SAYED, 2018). A administração por via oral de extrato aquoso quente de *A. platensis* ativou o sistema imune inato humano pelo aumento da produção de interferon e aumentou a citotoxicidade das células exterminadoras naturais ou *natural killer cells* (NK) (YEGANEH; TEIMOURI; AMIRKOLAIE, 2015).

Em organismos aquáticos cultivados, o uso de uma dieta enriquecida com a biomassa de *A. platensis* resultou em um aumento da atividade fagocítica e produção do ânion superóxido por células fagocitárias isoladas dos rins da carpa comum, *Cyprinus carpio* (WATANUKI *et al.*, 2006). A suplementação de dietas de peixes com *A. platensis* não apresentou efeitos negativos no crescimento dos indivíduos e ainda melhorou a pigmentação do filé (TEIMOURI; AMIRKOLAIE; YEGANEH, 2013).

2.2 Compostos fenólicos e flavonoides

Os compostos fenólicos são originários do metabolismo secundário e podem ser sintetizados pelos organismos em resposta a pressões do meio ambiente, por exemplo, ataque de patógenos, insetos, radiação UV, entre outros (CABRERA-CARRIÓN *et al.*, 2017), sendo encontrados em frutas, cebola, farelo de arroz, óleos essenciais e cianobactérias (PAGNUSSATT *et al.*, 2016).

Quando os organismos estão sob estresse, aumenta-se a possibilidade de se encontrar metabólitos funcionais únicos de importância farmacêutica, pois, nestas condições, normalmente, há um arranjo de adaptações fisiológicas e bioquímicas que frequentemente são acompanhadas por modificações na regulação de genes e rotas metabólicas (TIAN; LI; ZHAO, 2017). Foi demonstrado que os compostos fenólicos causam efeitos benéficos em condições ambientais adversas, tais como processos oxidativos e ataques patogênicos (PAGNUSSATT *et*

al., 2016). Porém, é importante salientar que mesmo quando o ambiente causa um estresse intenso aos organismos vivos, estes não necessariamente passarão a sintetizar novos compostos bioativos. No caso da exposição da microalga *Euglena gracilis* a elevadas concentrações de cádmio, por exemplo, não ocorreu um desencadeamento da produção de novos compostos fenólicos ou flavonoides (CERVANTES-GARCIA *et al.*, 2010). Entretanto, Castro *et al.* (2016) verificaram que os calos induzidos na planta *Byrsonima verbascifolia*, popularmente conhecida como murici-do-cerrado, foram responsáveis por um incremento na produção de compostos fenólicos e sugeriram que para a produção industrial destes metabólitos a indução de calos pode funcionar para aumentar a produção desses metabólitos.

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos com estruturas simples ou complexas contendo um anel aromático de carbono com um ou mais substituintes hidroxílicos. Eles são classificados quanto ao seu esqueleto principal (número de anéis aromáticos e hidroxilas), sendo encontrados no Reino Vegetal fazendo parte da estrutura de proteínas, alcaloides e terpenos. Flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanos e taninos são representantes da família dos fenóis, considerada a mais numerosa dos metabólitos secundários em plantas (ANGELO; JORGE, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

Compostos fenólicos, incluindo fenóis simples, flavonoides, fenilpropanoides, taninos, ligninas, ácidos fenólicos e seus derivados, sintetizados como metabólitos secundários, são considerados como uma das classes mais importantes de antioxidantes naturais e têm despertado crescente interesse tanto de consumidores quanto de fabricantes de alimentos, em virtude de seus benefícios para a saúde (BATISTA *et al.*, 2017).

As classes de fenólicos englobam compostos com estruturas diferentes que exercem influência sobre os efeitos biológicos, como o perfil de ácidos fenólicos incluindo vários componentes associados a ações antimicrobianas e antioxidantes (OH; FERNANDO; JEON, 2016; SCAGLIONI; DE OLIVEIRA-GARCIA; BADIÁLE-FURLONG, 2018).

O perfil de ácidos fenólicos identificados na biomassa da *Arthrospira* sp. correspondeu aos ácidos gálico, salicílico, trans-cinâmico e clorogênico (PAGNUSSATT *et al.*, 2014). Scaglioni, De Oliveira-Garcia e Badiále-Furlong (2018) relataram que os ácidos fenólicos presentes no extrato de *Spirulina* sp. na concentração de 10 µg mL⁻¹ foram os ácidos clorogênico (93%), hidroxibenzoico (3,9%), protocatecuico (2,6%) e gálico (0,3%).

A eficiência de extração de compostos fenólicos está diretamente relacionada à metodologia utilizada e à proporção massa/volume do solvente, sendo sua detecção feita por meio de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN,

2015). O processo de extração de compostos fenólicos consiste em um passo crítico após a preparação da amostra (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Embora compostos fenólicos tenham sido encontrados em microalgas fotossintizantes, sua determinação em microalgas não é frequente. O estudo das células que produzem esses compostos é ainda mais importante do que os próprios compostos fenólicos em si. O estabelecimento dos perfis dos compostos fenólicos das células pode identificar fontes fenólicas a serem aplicadas como conservantes naturais na cadeia alimentar ou no desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos (SCAGLIONI; DE OLIVEIRA-GARCIA; BADIALE-FURLONG, 2018).

2.3 Atividades biológicas da microalga *Arthrospira platensis*

2.3.1 Atividade antioxidante

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância capaz de retardar, impedir ou remover o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL, 2007). Do ponto de vista biológico, antioxidantes podem ser definidos como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ROGINSKY; LISSI, 2005).

A capacidade antioxidante total pode ser usada para avaliar compostos puros, alimentos ou outras matrizes. Para compostos puros, a atividade antioxidante é equivalente ao número de átomos de hidrogênio lábeis presentes em um composto, os quais podem ser abstraídos por um radical livre, ou expressos como fator estequiométrico (GOUPY *et al.*, 2003). A atividade antioxidante total apresenta uma grande variação entre as diferentes fontes (frutas, ervas, algas), podendo ser atribuída à abundância dos diferentes compostos que são responsáveis por essa atividade. Este parâmetro provê uma base quantitativa de comparação entre as diferentes fontes de antioxidantes (KASOTE *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2017).

Existem dois tipos principais de defesa antioxidante nos organismos: o enzimático e não-enzimático (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Os mecanismos antioxidantes enzimáticos podem prevenir a formação ou neutralizar radicais livres (defesas enzimáticas primárias) ou promover a redução de algum antioxidante que foi oxidado para que este possa novamente neutralizar novos radicais livres (defesas enzimáticas secundárias), dessa forma, eles não neutralizam os radicais livres diretamente (SHEBIS *et al.*, 2013). O grupo dos antioxidantes não-enzimáticos inclui vários subgrupos, sendo que os principais são: vitaminas (A, E e C),

cofatores enzimáticos, minerais (zinco e selênio), peptídeos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (ácido úrico). Os antioxidantes podem agir inibindo a formação de radicais livres resultantes da iniciação da oxidação de lipídios e as reações de oxidação pelos radicais livres, interrompendo a propagação das reações em cadeia no processo de auto-oxidação (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Existe uma grande importância em manter o balanço entre os antioxidantes e os radicais livres moleculares. Para o homem, por exemplo, uma perturbação nesse balanço pode levar a vários problemas de saúde como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e câncer (VALKO *et al.*, 2007).

A maioria dos alimentos e produtos farmacêuticos contém antioxidantes sintéticos os quais são adicionados para prolongar o tempo de prateleira dos produtos alimentares e para aumentar a estabilidade dos agentes terapêuticos dos produtos farmacêuticos suscetíveis à degradação química causada pela oxidação. Devido a isto, várias pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de produzir novos e eficientes antioxidantes de fontes alternativas encontradas na natureza em grande quantidade (SHEBIS, *et al.*, 2013).

O mercado global de produtos antioxidantes foi estimado em cerca de 86 bilhões de dólares americanos em 2016, contudo, a oferta constante de antioxidantes bioativos naturais continua sendo o fator limitante para aplicação biotecnológica, alimentícia e nutracêutica (MURRAY *et al.*, 2013).

Dentre o grupo de compostos que apresentam atividade antioxidante, destacam-se os compostos fenólicos os quais pertencem a uma classe de metabólitos secundários contendo um anel aromático de carbono com um ou mais substituintes hidroxílicos. Eles são classificados quanto ao número de anéis aromáticos e hidroxilas, sendo encontrados como parte da estrutura de proteínas, alcaloides e terpenos. Incluídos na classe mais numerosa de metabólitos secundários em plantas, flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanos e taninos são todos representantes da família dos fenóis (SILVA *et al.*, 2017; SOUSA, 2017).

Estudos recentes demonstraram que algumas espécies de algas contêm grandes quantidades de antioxidantes e compostos fenólicos. Os principais antioxidantes encontrados em microalgas são as vitaminas C e E (BISHOP; ZUBECK, 2012), carotenoides (α - e β -caroteno, zeaxantina) (GOIRIS *et al.*, 2012; MENDIOLA *et al.*, 2007), compostos fenólicos (PLAZA *et al.*, 2010; KUNTZLER *et al.*, 2018) e clorofila (CHA *et al.*, 2010).

Frente à diversidade de estruturas químicas dos compostos antioxidantes e de seus mecanismos de ação, vários ensaios têm sido utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras (CRUZ, 2016). Nesses ensaios, um radical é gerado e reage com

moléculas-alvo, normalmente para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes nos extratos testados altera esses sinais, permitindo sua análise quantitativa (DAGLIA, 2012).

2.3.2 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas são um problema grave e causam morbidade momentânea e mortalidade em todo o mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, onde elas são responsáveis por aproximadamente 50% de todas as mortes, tendo em vista que o acesso à assistência médica é inadequado. Nos países desenvolvidos, esse percentual gira em torno de 20% (MOSAFFA-JAHROMI *et al.*, 2016).

As infecções fúngicas invasivas representam uma ameaça contínua e séria à saúde humana e estão associadas a pelo menos 1,5 milhão de mortes anuais em todo o mundo (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

Em comparação com o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos, o desenvolvimento de fármacos antifúngicos é mais desafiador porque os fungos são eucariotos e muitos alvos potenciais para terapia também são encontrados em humanos, com riscos substanciais de toxicidade do hospedeiro (CAMPOY; ADRIO, 2017). Os antifúngicos têm várias desvantagens em termos de grau de toxidez, espectro de atividade, segurança e propriedades farmacocinéticas (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

A avaliação da atividade antifúngica de compostos extraídos de fontes naturais como ervas, plantas medicinais, especiarias, frutas, verduras e macro e microalgas tem sido realizada utilizando-se o teste de difusão em ágar, no qual os discos de papel são embebidos com o extrato-teste e colocados sobre um meio de crescimento já inoculado com o micro-organismo. O tempo de incubação depende do fungo (RASOOLI; ABYANEH, 2004; SCAGLIONI; DE OLIVEIRA-GARCIA; BADIALE-FURLONG, 2018) ou da bactéria (PALIWAL *et al.*, 2016; RAUHA *et al.*, 2000) que está sendo avaliada. O teste pode ser realizado com o extrato bruto ou com o composto isolado, adicionando-se ao meio o fungo, inoculado a partir de uma solução de esporos ou um disco com um micélio de fungo para avaliar o crescimento radial (NGUEFACK *et al.*, 2004; PAGNUSSATT *et al.*, 2014).

Biofilme consiste em um grupo de bactérias envolvidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que representa um importante fator de virulência responsável pela patogênese de *Pseudomonas aeruginosa* (LEWISOSCAR *et al.*, 2018). A formação de biofilme é uma das características dominantes de bactérias que desenvolvem

resistência a múltiplos fármacos. Em *P. aeruginosa*, a formação de biofilme é controlada por um mecanismo de comunicação célula a célula chamado *quorum sensing* (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

Várias estratégias, por exemplo, revestimento antimicrobiano e nanopartículas, foram desenvolvidas contra o biofilme de *P. aeruginosa*, mas falharam devido à capacidade dessas bactérias em desenvolver resistência intrínseca (LEWISOSCAR *et al.*, 2018).

Compostos sintetizados quimicamente foram utilizados contra o biofilme de *P. aeruginosa*, mas suas principais desvantagens foram alto custo, disponibilidade e efeitos colaterais (TOUTAIN-KIDD *et al.*, 2009). Considerando essas questões, várias pesquisas voltaram-se para as fontes naturais a fim de encontrar compostos bioativos com efeito contra o biofilme de *P. aeruginosa*.

A identificação de novos alvos terapêuticos pelo uso de técnicas genômicas e o conhecimento crescente sobre os processos celulares necessários para a sobrevivência e virulência dos fungos e bactérias ajudarão a encontrar e desenvolver compostos com novas formas de ação (CAMPOY; ADRIO, 2017).

A concentração inibitória mínima (CIM), cujo método se baseia na determinação da quantidade mínima de extrato capaz de inibir o crescimento do micro-organismo de interesse, pode ser determinada através de três técnicas: diluição em caldo, diluição em ágar e microdiluição em caldo de cultivo, todas elas baseadas no emprego de diluições em série do extrato aplicadas a uma mesma concentração da bactéria testada (CRUZ, 2016).

As variações referentes às determinações antimicrobianas dos extratos testados podem ser atribuídas a diversos fatores. Dentre eles, é possível destacar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem do material utilizado, a época da coleta, a preparação dos extratos se a partir de fontes frescas ou secas, as condições de cultivo e a quantidade de extrato testado. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNELL *et al.*, 2004; PLAZA *et al.*, 2010).

2.3.3 Atividade anticâncer

O câncer é uma classe de doenças caracterizada por um crescimento celular fora do controle, que se tornou uma das principais causas de morte no mundo. Os sintomas do câncer são bastante variados e dependem de onde o câncer está localizado, por onde ele se espalhou ou o quanto os tumores cresceram (LI *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, tem-se visto o desenvolvimento de câncer de uma forma linear; as aberrações na oncogênese e nos supressores de tumor se acumulam a um ponto em que as células são totalmente malignas. Atualmente, tem-se uma compreensão limitada do número de mudanças necessárias na maquinaria celular para a iniciação e a progressão do tumor e o(s) efeito(s) do microambiente tumoral nesses eventos (YADAV *et al.*, 2018). Acredita-se que, na maioria dos cânceres, sejam necessárias entre duas e vinte mutações na maquinaria celular para que o câncer se torne totalmente maligno (BEERENWINKEL *et al.*, 2007).

O câncer de próstata tem elevada taxa de mortalidade, especialmente nos países industrializados. É uma doença importante em termos de estratégias quimiopreventivas devido à idade tardia de início, progressão lenta, alta incidência, lesões pré-neoplásicas identificadas e grupos de risco (SZLISZKA *et al.*, 2011). Os métodos utilizados no diagnóstico da doença são limitados por sua especificidade e sensibilidade. Além disso, esses métodos podem não ser capazes de distinguir entre pacientes com prognóstico mais favorável e pacientes com maior risco de morte. Portanto, o câncer de próstata é frequentemente diagnosticado em estágio avançado (CIMINO *et al.*, 2012; EROĞLU *et al.*, 2018).

Como o câncer de próstata geralmente se desenvolve tardiamente, identificar compostos de fontes naturais que previnam ou retardem a progressão da doença pode ter um efeito positivo na qualidade de vida além de reduzir os custos de saúde relacionados ao envelhecimento da população (CIMINO *et al.*, 2012; ŚLUSARZ *et al.*, 2010).

Em mulheres, o câncer de mama é o de diagnóstico mais comum. No mundo, foram estimados 1,7 milhão de casos de câncer de mama, e o número de mortes foi de 521.900 casos em 2012. É sabido que o câncer de mama é responsável por 25% de todos os casos de câncer feminino e 15% das mulheres acometidas com câncer morreram por conta do câncer de mama em 2012 (TORRE *et al.*, 2015). Acredita-se que o câncer de mama seja responsável por 30% de todos os novos casos de cânceres diagnosticados e que a nova taxa de mortalidade por câncer de mama represente 14% de todos os cânceres diagnosticados entre as mulheres em 2017 (JIANG *et al.*, 2018; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Algumas ficobiliproteínas apresentam atividade anticâncer. A C-ficocianina purificada de *A. platensis*, por exemplo, apresentou inibição da proliferação de células com neoplasia e distúrbio no ciclo celular de células cancerosas (JIANG *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2005).

Os tratamentos clínicos do câncer incluem cirurgia, quimioterapia e radioterapia apresentando desvantagens por geralmente não serem eficazes e específicos além de propiciar efeitos colaterais como resistência a drogas e toxicidade (LI *et al.*, 2015; PANDA *et al.*, 2014;

ZHANG *et al.*, 2011). Assim, o direcionamento específico de células cancerosas continua sendo uma questão-chave na pesquisa do câncer. As estratégias para alcançar tal direcionamento seletivo dos sistemas terapêuticos e/ou dos sistemas e administração para as células cancerígenas incluem pares anticorpo-antígeno e ligante-receptor, assim como vitaminas, aptâmeros e estruturas proteicas (DISSANAYAKE *et al.*, 2017; NYSTRÖM; MALMSTEN, 2018). Outra estratégia utilizada recentemente no tratamento de câncer consiste na indução de apoptose da célula cancerígena, e o uso de agentes desencadeadores com essa habilidade tem atraído um interesse maior nos últimos anos (DO NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo da microalga *Arthrospira platensis*

A microalga *A. platensis* foi cultivada em um meio contendo ureia ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) e superfosfato triplo (SPT – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), mantendo-se o cultivo unialgal com células em um bom estado fisiológico.

O sistema de produção consistiu em sete caixas d'água de polietileno, sendo seis de 500 L e uma de 1.000 L de volume útil. As caixas, mantidas abertas, foram instaladas ao ar livre na Estação de Aquicultura Prof. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP) da Universidade Federal do Ceará (UFC), em local ensolarado, com iluminância de aproximadamente $1.500 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Ao fim do dia, todas as caixas eram cobertas com as tampas, sendo abertas logo ao amanhecer, para permitir a captação de luz solar pela *A. platensis*. Da mesma forma, as caixas eram fechadas por ocasião de precipitação pluviométrica para evitar entrada de água da chuva.

As caixas estavam enfileiradas e conectadas por canos de PVC de 25 mm de diâmetro no abastecimento e 100 mm de diâmetro na drenagem. A caixa de 1.000 L estava disposta em uma cota inferior, comparada com as caixas de 500 L, de modo a permitir a drenagem das caixas menores para a maior (FIGURA 1).

Figura 1 - Sistema de produção da microalga *Arthrospira platensis* na Estação de Aquicultura Prof. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.



Fonte: AUTOR

O retorno do cultivo para as caixas de 500 L ocorria por meio de uma bomba d'água com vazão de 7.000 L h^{-1} que promovia a recirculação contínua do cultivo, homogeneizando o

conteúdo de todas as caixas. Cada uma das caixas de 500 L possuía uma torneira que permitia a regulagem individual do fluxo do volume do cultivo bombeado.

As condições de cultivo de *A. platensis* foram salinidade 10 e pH 10, mantidas pela adição de sal marinho e bicarbonato de sódio, respectivamente, e temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ às 14 h (horário local).

3.2 Coleta e liofilização da biomassa da microalga *Arthrospira platensis*

A densidade do cultivo foi acompanhada pela leitura da absorbância no comprimento de onda de 680 nm em espectrofotômetro portátil (Hach DR 2700TM). Leituras superiores a 0,800 indicaram densidade ideal para obtenção da biomassa da microalga, momento em que foi realizado o processo de filtração em malha de náilon, um tipo de filtro comercialmente denominado *bag*.

Após a filtração, a biomassa foi lavada abundantemente com água corrente e, posteriormente, com água destilada. A biomassa foi transferida para placas de Petri, congelada e liofilizada (Liotop L101), durante 4 a 5 dias a -57°C e 219 μmHg . Após a liofilização, a biomassa desidratada foi macerada e armazenada a -20°C para posterior uso nos procedimentos de análise.

3.3 Preparação dos extratos da microalga *Arthrospira platensis*

Para o pré-tratamento da biomassa liofilizada de *A. plantesis*, 9,02 g foram colocados em um balão de 500 mL e minimamente misturados com metanol, apenas o suficiente para umedecer a biomassa ($\pm 0,6 \text{ mL g}^{-1}$), assim mantidos por 2 min. Este pré-tratamento com metanol favoreceu a perda da estrutura da parede celular, devido à natureza polar do metanol que aumenta a permeabilidade da parede celular da microalga, contribuindo para potencializar o tratamento ultrassônico (DEY; RATHOD, 2013).

Após o pré-tratamento, em um balão de 500 mL, foram adicionados 300 mL de hexano à biomassa, o qual foi levado para o sonificador ultrassônico (Branson Digital Sonifier 450), configurado para operar nas condições semelhantes às aquelas descritas por Dey e Rathod (2013), a saber: pulso ligado 5 s, pulso desligado 3,1 s, ciclo de trabalho 61,7%, tempo 10 min, frequência 20 Hz e potência 212 W.

Após a retirada da fase líquida (hexano mais os compostos nele dissolvidos), foi colocado acetato de etila no mesmo balão, junto com o material residual, os quais foram

sonicados nas mesmas condições anteriores. Esse processo se repetiu até que os extratos dos quatro solventes, previamente escolhidos (hexano, acetato de etila, metanol e metanol e água 1:1, v/v) fossem obtidos, respeitando-se a ordem crescente de polaridade dos solventes.

Os extratos obtidos nas quatro extrações foram concentrados separadamente em evaporador rotativo (Fisatom 802), tendo sido denominados de extrato hexânico (Hx), extrato acetato de etila (AcOEt), extrato metanólico (MeOH) e extrato metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1). Os rendimentos das extrações foram determinados segundo a equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\text{Biomassa extraída}}{\text{Biomassa total}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Os extratos concentrados foram suspensos em metanol (MeOH), imediatamente antes do uso, para a quantificação de compostos fenólicos totais e teor de flavonoides, determinação da atividade antioxidante *in vitro*, análises microbiológicas e atividade anticâncer. As concentrações dos extratos utilizadas nos testes foram: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg mL⁻¹.

3.4 Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos da microalga *Arthrospira platensis*

O CFT foi determinado pela metodologia descrita por Ainsworth e Gillespie (2007). A reação consistiu na mistura de 100 µL dos extratos (Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O 1:1) nas concentrações de 5 a 1.000 µg mL⁻¹, 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% e, após vigorosa agitação, 800 µL de carbonato de sódio a 700 mM. Após 2 h de incubação no escuro à temperatura ambiente, 200 µL do volume foram transferidos para placas de poliestireno de 96 poços, e as absorbâncias lidas no comprimento de onda de 765 nm em leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340), contra um controle contendo todos os reagentes exceto o extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

A quantificação de CFT foi feita por comparação com uma curva de calibração usando ácido gálico - 3,4,5-triidroxibenzoico (G7384, Sigma), nas concentrações de 8,51 a 170,12 µg mL⁻¹. Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por grama (g) do extrato algal.

A determinação do CFT em todas as concentrações (5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) teve como objetivo permitir que o resultado do CFT fosse calculado naquela(s) concentração(ões) em que os valores de absorvância estivessem na região de linearidade da curva padrão do ácido gálico.

3.5 Quantificação do teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF) nos extratos da microalga *Arthrospira platensis*

O teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF) foi determinado pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl_3), descrito por Ahn *et al.* (2007) e Pekal e Pyszynska (2014).

A reação consistiu na mistura de 0,5 mL dos extratos nas diferentes concentrações (5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 0,5 mL da solução de AlCl_3 em etanol (EtOH) a 2% (p/v). Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, as absorvâncias foram mensuradas em leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340), no comprimento de onda de 420 nm. No branco, o volume do extrato foi substituído por metanol. As análises foram realizadas em triplicata.

A quantificação de TF foi feita por comparação com uma curva de calibração usando quercetina (33.795-1, Aldrich), nas concentrações 10, 25, 50, 100 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em micrograma (μg) de quercetina por grama (g^{-1}) do extrato algal.

Similarmente ao CFT, a determinação do TF foi feita em todas as concentrações (5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para permitir que o resultado fosse calculado naquela(s) concentração(ões) em que os valores de absorvância estivessem na região de linearidade da curva padrão da quercetina.

3.6 Atividades antioxidantes *in vitro* nos extratos da microalga *Arthrospira platensis*

3.6.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante, medida pela capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), foi determinada segundo Kato *et al.* (2016), com algumas modificações, com base no método original descrito por Blois (1958). Em placas de poliestireno de 96 poços, nos poços denominados amostra foram adicionados 10 μL dos extratos (nas concentrações de 5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 190 μL da solução metanólica de DPPH (D9132, Sigma) a 78 μM . Nos poços denominados branco da amostra foram adicionados 10 μL dos extratos nas

concentrações supracitadas e 190 µL de metanol. Nos poços denominados controle da amostra (controle negativo) foram adicionados 10 µL de metanol e 190 µL da solução metanólica de DPPH a 78 µM. O *L*-ácido ascórbico (A5960, Sigma) foi utilizado como controle positivo, nas mesmas concentrações dos extratos e tratado de forma idêntica.

As placas contendo amostra, branco da amostra, controle da amostra e controle positivo foram agitadas e incubadas à temperatura ambiente por 30 min no escuro. Posteriormente, as absorvâncias foram lidas em 517 nm em leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340). As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. A capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos e do controle positivo, expressos em porcentagem, foram calculados pela equação 2.

$$\text{Capacidade de sequestro do radical DPPH (\%)} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100\% \quad (2)$$

3.6.2 Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC)

A capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC) foi determinada de acordo com Wang, Jónsdóttir e Ólafsdóttir (2009) com modificações. Em placas de poliestireno de 96 poços, 100 µL dos extratos nas concentrações de 5 a 1.000 µg mL⁻¹ foram misturados com 135 µL de água destilada, 5 µL de cloreto ferroso (FeCl₂) a 2 mM e 10 µL de ferrozina a 5 mM nos poços denominados amostra. Nos poços denominados branco da amostra, a ferrozina foi substituída por igual volume de água destilada, enquanto nos poços denominados controle da amostra (controle negativo), os extratos foram substituídos por água destilada. Como controle positivo foi utilizado EDTA (etilenodiamino tetra-acético sal dissódico - C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O - Vetec), nas mesmas concentrações dos extratos e sendo tratado de forma idêntica.

As placas contendo amostra, branco da amostra, controle da amostra e controle positivo foram incubadas por 10 min à temperatura ambiente e, em seguida, as absorvâncias lidas em 562 nm utilizando uma leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340). As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração.

O FIC dos extratos e do controle positivo, expresso em porcentagem, foi calculado pela equação 3.

$$\text{Capacidade de quelação de íons ferrosos (\%)} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right] \times 100\% \quad (3)$$

3.6.3 Poder de redução de íons férricos (FRAP)

O poder de redução de íons férricos (FRAP) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Khatua, Roy e Acharya (2013) com algumas modificações. Foram adicionados 2,5 mL de tampão fosfato a 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1% aos tubos contendo 0,5 mL dos extratos nas concentrações de 5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubados a 50°C por 20 min. Após o período de incubação e resfriamento dos tubos, 1,25 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foi acrescentado aos tubos para parar a reação. Após centrifugação a 3.000 rpm por 10 min, 2 mL da camada superior da mistura reacional foram retirados e misturados com 2 mL de água destilada e 0,4 mL de cloreto férrico a 0,1%, totalizando um volume final de 4,4 mL. Os tubos foram incubados por 10 min em temperatura ambiente. Depois disso, 200 μL da mistura reacional dos tubos de ensaio foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços, e as absorvâncias lidas em 700 nm em uma leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340). Como controle positivo foi utilizado *L*-ácido ascórbico (A5960, Sigma), nas mesmas concentrações dos extratos, o qual foi tratado de forma idêntica. As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração.

Quanto maior a absorvância dos extratos e do controle positivo, maior o poder de redução de íons férricos (FRAP).

3.6.4 Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB)

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada usando-se o sistema β -caroteno e ácido linoleico (DUAN *et al.*, 2006). Inicialmente, 4 mL de uma solução de β -caroteno (C9750, Sigma) em clorofórmio (1 mg mL^{-1}) foram transferidos para um balão contendo 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi evaporado sob vácuo a 40°C em evaporador rotativo, e 100 mL de água destilada saturada de oxigênio foram adicionados lentamente ao resíduo semisólido, sob vigorosa agitação por 1 min até a formação de uma emulsão estável, denominada emulsão com β -caroteno (EC β).

As absorvâncias foram medidas, imediatamente (tempo 0), em leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340) em 470 nm, contra um branco da amostra consistindo em 50 μL dos extratos nas concentrações de 5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mais 200 μL de uma outra emulsão que foi preparada nas mesmas condições da EC β porém sem o acréscimo β -caroteno (ES β). Também foram preparados controles da amostra (controles negativos) com 50 μL de

MeOH e 200 μL de $\text{EC}\beta$. As placas foram deixadas a temperatura ambiente (23°C), e as leituras das absorbâncias conduzidas em intervalos de 30 min até 300 min (tempo final). As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração.

O *L*-ácido ascórbico (A5960, Sigma), nas mesmas concentrações dos extratos, foi utilizado como controle positivo, sendo tratado da mesma forma dos extratos.

As atividades antioxidantes dos extratos e do controle positivo foram avaliadas em termos de atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB), usando a equação 4, descrita por Dhongade e Chandewar (2013).

$$\text{Degradação do } \beta\text{-caroteno (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{tempo final}}}{\text{Abs}_{\text{tempo inicial}}} \right) \times 100\% \quad (4)$$

3.7 Análises microbiológicas

O potencial antimicrobiano (concentração inibitória mínima e antifúngico) e antibiofilme dos quatro extratos de *A. platensis* (Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O 1:1) foi avaliado. Os micro-organismos usados como indicadores desse potencial foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) e/ou da coleção microbiológica do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR)/UFC, onde as análises foram realizadas. Os extratos foram diluídos com água destilada para obtenção da solução na concentração de 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual foram feitas as demais soluções nas concentrações adequadas para os experimentos.

3.7.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *A. platensis*, sobre o crescimento bacteriano, foi realizado pela técnica padrão de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços.

Utilizando a solução estoque de 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada extrato, foram obtidas as menores concentrações nos micropoços adicionando-se as alíquotas de cada extrato (5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o caldo Muller Hinton (MH) duplo e o inóculo bacteriano ajustado a escala de McFarland 0,5 de maneira que o volume final em cada poço fosse de 200 μL .

Foram testadas as concentrações de 100, 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) frente as bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922),

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) e *Salmonella* ser. Braenderup (LAMAP18), com os testes feitos em triplicata (QUADRO 1).

Quadro 1 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) nos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 a 1.000 µg mL⁻¹.

Concentração (µg mL ⁻¹)	Extrato (5.000 µg mL ⁻¹)	Caldo MH duplo (µL)	Inóculo bacteriano (µL)	Volume final (µL)
100	4	146	50	200
250	10	140	50	200
500	20	130	50	200
1.000	40	110	50	200

Fonte: AUTOR

Como controle negativo (CN) foram utilizados 150 µL de caldo MH duplo mais 50 µL do inóculo bacteriano ajustado a escala de McFarland 0,5 e, como controle positivo (CP), foram utilizados 100 µL de caldo MH duplo mais 50 µL do inóculo bacteriano mais 50 µL de solução de canamicina a 120 µg mL⁻¹, de modo que os poços do CP tivessem uma concentração final do antibiótico de 30 µg mL⁻¹.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Para avaliar o crescimento bacteriano após a incubação, foi observada a turbidez dos poços e, em cada poço da microplaca, foram adicionados 20 µL de uma solução de cloreto trifênil tetrazólio (CTT) a 5%, procedeu-se então nova incubação da microplaca a 35°C por 3 h. Após esse período, foi avaliado o crescimento bacteriano pela presença ou não de coloração vermelha nos poços.

Após o CIM, foram retiradas alíquotas dos poços de 100 e de 1.000 µg mL⁻¹ com auxílio de uma alça de níquel-cromo, as quais foram estriadas em placas contendo ágar Muller Hinton (MH) e testadas frente a cepa *S. aureus*. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h.

3.7.2 Atividade antifúngica

Para determinar a atividade antifúngica, foi utilizado o método de difusão em disco (CLSI, 2010). Discos brancos de celulose (Laborclin) estéreis foram embebidos com os extratos de *A. platensis* nas concentrações (100 e 500 µg mL⁻¹), sendo sete discos para cada extrato. No

CN os discos foram embebidos em água destilada e no CP, eles foram embebidos com nistatina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os quatro extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) de *A. platensis* foram testados frente ao fungo filamentoso *Aspergillus niger* e à levedura *Candida albicans*.

As culturas fúngicas foram repicadas para placas de Petri contendo ágar dextrose batata (ADB) e incubadas por 7 dias a 28°C. Após esse período de tempo, os discos com as diferentes concentrações dos extratos (100 e 500 $\mu\text{g/mL}$), CN e CP (100 $\mu\text{g/mL}$) foram dispostos em novas placas de Petri contendo ADB. Nas placas onde houve crescimento de *A. niger*, foram retirados *slots* para serem depositados na região central da placa, próximos aos discos dos extratos, do CN e do CP.

Para os testes com a levedura *C. albicans*, a cultura foi ajustada a escala de McFarland 0,5 e, com um *swab* estéril, foram feitos tapetes na superfície de placas de ADB. Posteriormente, os discos embebidos com os extratos nas diferentes concentrações (100 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com o CN e com o CP foram dispostos nas placas, as quais foram incubadas por 7 dias a 28°C. O resultado foi considerado positivo quando houve surgimento de zona de inibição de crescimento, em qualquer grau, ao redor dos discos de papel.

3.7.3 Atividade antibiofilme

Para o teste de inibição da formação de biofilme, foi utilizada a técnica da aderência em microplacas de poliestireno (TMC) de acordo com a descrição de Christensen *et al.* (1985), com adaptações.

A atividade antibiofilme dos extratos (Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O 1:1) de *A. platensis* foi testada frente a cepa Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), reconhecidamente produtora de biofilme.

Inicialmente, foi feita a repicagem das cepas bacterianas a serem testadas para tubos de ensaio contendo ágar tripton de soja (TSA) inclinado, os quais foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24 h. Em seguida, o inóculo bacteriano foi ajustado a escala de McFarland 0,5 com solução salina 0,85%. A turbidez foi determinada pela leitura de absorbância no intervalo de 0,08 a 0,1 em espectrofotômetro (Thermo BioMat3) no comprimento de onda de 625 nm.

Também utilizando a solução estoque de $5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada extrato, foram obtidas as concentrações de 100 e $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos micropoços adicionando alíquotas de cada extrato ($5.000 \mu\text{g mL}^{-1}$), caldo Luria Bertani (LB) duplo e o inóculo bacteriano ajustado a escala

de McFarland 0,5, de maneira que o volume final em cada poço fosse de 200 μL (QUADRO 2).

Quadro 2 - Determinação da atividade antibiofilme nos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Extrato (5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Caldo LB duplo (μL)	Inóculo bacteriano (μL)	Volume final (μL)
100	4	96	100	200
1.000	40	60	100	200
Controle negativo	-	100	100	200

Fonte: AUTOR

Em seguida, as microplacas de poliestireno com 96 poços com fundo em U foram incubadas a 35°C por 48 h. O teste foi realizado em triplicata.

Após o período de incubação, os inóculos contidos nos poços foram desprezados, e as placas foram lavadas três vezes com água destilada. As placas foram incubadas para secagem em estufa a 60°C por 1 h. Logo após, os poços foram corados com solução de cristal violeta a 1% e deixados à temperatura ambiente por 1 min. Procederam-se três lavagens sucessivas dos poços com água destilada e secagem das microplacas em temperatura ambiente.

Após a secagem das microplacas foi realizada uma análise visual dos poços para verificar a presença ou ausência de coloração roxa. Para avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilme, foram considerados positivos os extratos que inibiram a aderência, evidenciado pela ausência de coloração roxa no interior dos poços.

3.8 Atividade contra células de câncer

3.8.1 Linhagens celulares e condições de cultivo das células de câncer

Foram utilizadas as linhagens MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e LNCaP clone FGC (carcinoma da próstata metastático), ambas obtidas da ATCC® (*American Type Culture Collection*, USA) através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As linhagens foram cultivadas em frascos T-25 contendo meio RPMI 1640 (GE-Hyclone®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (GIBCO® - Life Technologies), 1% de L-glutamina, penicilina

(100 U mL⁻¹) e estreptomicina (100 µg mL⁻¹) (GIBCO® - Life Technologies), e mantidas a 37°C, em uma atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada três dias e, ao atingirem 90% de confluência, as células foram tripsinizadas (0,025% tripsina / 0,1% EDTA) para subcultura e/ou ensaios de viabilidade e migração celular.

3.8.2 Ensaio de viabilidade celular

Após a tripsinização, as células ($2 \times 10^4/200 \mu\text{L/poço}$) foram incubadas em placas de poliestireno de fundo chato (96 poços), mantidas por 24 h em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi retirado e adicionaram-se 200 µL de meio RPMI contendo os extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1), nas concentrações de 200; 20; 2 e 0,2 µg mL⁻¹. Após 48 h, o meio foi retirado e substituído por 100 µL de meio não suplementado no qual adicionaram-se 20 µL da solução de sal tetrazólio MTS (*CellTiter 96® Aqueous MTS Reagent Powder*, Promega, WI, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 490 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax i3 Multi-Mode Microplate Reader). Foram realizados três ensaios de viabilidade independentes e em triplicata. A viabilidade celular foi calculada pela equação 5.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\overline{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{extrato})}{\overline{Abs}_{490 \text{ nm}}(\text{controle})} \times 100\% \quad (5)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições de cultivo da microalga *Arthrospira platensis* e rendimentos das extrações

As condições escolhidas para o cultivo da microalga *A. platensis* foram consideradas ideais e estabelecidas de modo a se obter o melhor desempenho produtivo possível. Com o objetivo de manter o cultivo unialgal, e atentos para o fato de que o sistema de cultivo foi montado próximo a tanques da Estação de Aquicultura e ao Açude Santo Anastácio, o que poderia representar uma possível fonte de contaminação, o pH elevado garantiu condições severas para impedir a entrada de microalgas competidoras e/ou predadores como copépodos e rotíferos (DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2018; HUANG *et al.*, 2014).

Tradicionalmente, a extração de vários compostos bioativos a partir de produtos naturais tem sido realizada em muitas indústrias usando diferentes solventes. Os métodos convencionais de extração, como maceração e extração em Soxhlet apresentam muitos inconvenientes como a utilização de grandes quantidades de solventes, longo tempo de extração e menor rendimento de extração. Recentemente, os pesquisadores concentraram-se em técnicas de extração mais eficientes como a extração assistida por ultrassom, extração assistida por micro-ondas, extração com fluido supercrítico e extração de fluido pressurizado, com o objetivo de superar essas desvantagens (DEY; RATHOD, 2013; WANG; WELLER, 2006). Contudo, dentre todas essas técnicas, o ultrassom é uma opção que se destaca por ser barata e simples, podendo substituir as técnicas tradicionais de extração (WANG *et al.*, 2008).

O processo de extração por ultrassom usa cavitação acústica para produzir bolhas de cavitação que implodem resultando em altas forças de cisalhamento. Isso causa uma perturbação na parede celular permitindo que o solvente penetre no material alvo da extração e aumente a área de superfície de contato entre o solvente e o composto de interesse, resultando em uma maior transferência de massa, além de proporcionar uma melhor mistura (DEY; RATHOD, 2013; VINATORU *et al.*, 1997). Assim sendo, o uso do ultrassom fornece maior rendimento na extração, maior taxa de extração, tempo de extração reduzido e maior taxa de processamento com a vantagem da redução da temperatura e do volume de solvente utilizado (LUQUE-GARCIA; DE CASTRO, 2003), o que é muito útil para a extração de compostos termicamente lábeis (DEY; RATHOD, 2013; VINATORU, 2001).

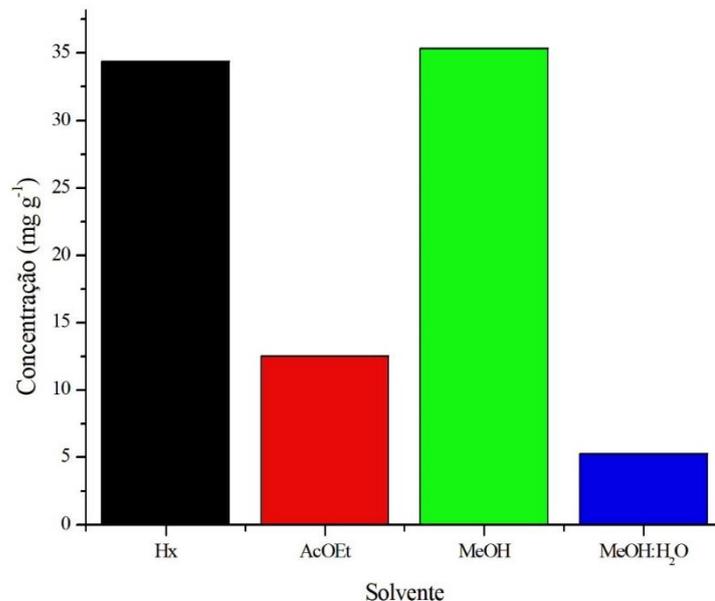
No presente trabalho, as condições de extração por ultrassom foram estabelecidas para otimizar a extração dos compostos com atividade biológica da microalga *A. platensis*. A

otimização das condições de extração é um processo crítico pois vários parâmetros podem potencialmente afetar o processo de extração por ultrassom.

O uso de uma série de solventes de polaridade crescente é comum para alcançar um certo grau de fracionamento (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

A biomassa inicial de *A. platensis* correspondeu a 9,02 g e foi considerada 100%. A partir dela, foram obtidos 0,310 g de extrato Hx, 0,113 g de extrato AcOEt, 0,319 g de extrato MeOH e 0,0474 g de extrato MeOH:H₂O (1:1), equivalendo a rendimentos de 3,44%, 1,25%, 3,54% e 0,52%, ou 34,37 mg g⁻¹, 12,53 mg g⁻¹, 35,37 mg g⁻¹ e 5,25 mg g⁻¹, respectivamente (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 – Rendimento das extrações da biomassa da microalga *Arthrospira platensis* com os solventes hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1), em ordem crescente de polaridade.



Fonte: AUTOR

De acordo com a literatura, os rendimentos de extratos de microalgas, assim como os de macroalgas, são sempre baixos quando comparados com àqueles de vegetais terrestres.

Michael *et al.* (2018) relataram rendimentos entre 6,83% e 21,63%, resultado superior ao obtido no presente trabalho, porém o processo de extração utilizado por eles foi repetido três vezes para cada biomassa, enquanto que no presente trabalho a biomassa inicial foi extraída uma única vez com cada solvente e de forma sequencial.

Os rendimentos mais altos (3,54% e 3,44%) foram encontrados usando metanol e hexano, respectivamente. Um alto rendimento na extração de biomoléculas pelo hexano

(solvente apolar) pode ser explicado pelo fato de as interações entre a membrana e o solvente reduzirem a hidrofobicidade da membrana por apresentar uma maior afinidade por solventes apolares levando a alterações nas características da membrana o que contribui para sua ruptura (VAN GESTEL *et al.*, 2003) e, provavelmente, por conter uma grande quantidade de lipídios (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

O alto rendimento do extrato MeOH pode ser explicado pela alta extração de compostos polares (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

Já os rendimentos dos extratos AcOEt (1,25%) e MeOH:H₂O 1:1 (0,52%) foram inferiores. Deve-se observar que as quatro extrações foram feitas em sequência sobre a mesma biomassa (substrato), obedecendo a ordem crescente de polaridade dos solventes.

Estes resultados mostram que a extração de biomoléculas de *A. platensis*, sob as condições utilizadas no presente trabalho, ocorre com uma menor exposição de tempo e com um maior rendimento do que os empregados por outros métodos para a mesma microalga (DEJSUNGKRANONT; CHEN; SIRISANSANEEYAKUL, 2017; DEY; RATHOD, 2013; SILVA *et al.*, 2017).

4.2 Quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) nos extratos da microalga *Arthrospira platensis*

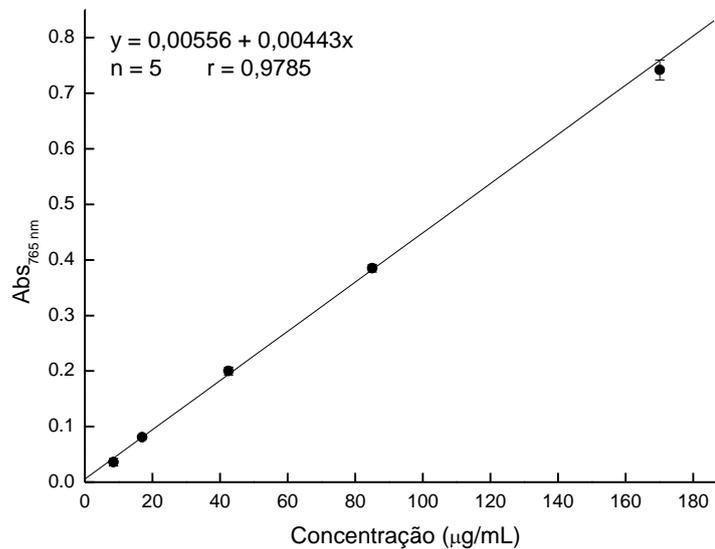
A curva padrão do ácido gálico (G7384 Sigma) nas concentrações de 8,51 a 170,12 µg mL⁻¹ foi usada para a quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) de *A. platensis* (GRÁFICO 2).

O presente estudo mostrou que os solventes tiveram efeito sobre a extração dos compostos fenólicos (TABELA 1). Os extratos Hx e AcOEt apresentaram os maiores rendimentos na extração dos compostos fenólicos (73,34 e 99,00 mg EAG g⁻¹ extrato, respectivamente), enquanto os extratos MeOH e MeOH:H₂O (1:1) apresentaram rendimentos inferiores (30,49 e 26,21 mg EAG g⁻¹ extrato, respectivamente).

A variação do rendimento das extrações pode ser explicada pelas diferentes polaridades de compostos fenólicos que foram seletivamente mais solúveis em diferentes solventes (NGO *et al.*, 2017). Como as extrações foram feitas de forma sequencial e os solventes Hx e AcOEt apresentam altos rendimentos, a disponibilidade dos compostos fenólicos para as extrações subsequentes usando solventes de maior polaridade (MeOH e MeOH:H₂O 1:1) pode ter sido reduzida. Além disso, este resultado mostra que nenhum solvente

é capaz de retirar todos os compostos fenólicos, evidenciando a grande variedade de polaridade desses metabólitos.

Gráfico 2 - Curva padrão do ácido gálico (G7384 Sigma) em concentrações de 8,51 a 170,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTOR

Tabela 1 – Compostos fenólicos totais (CFT), expressos em mg de equivalente ácido gálico (EAG) por g dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*.

Extratos	CFT (mg EAG g ⁻¹ extrato) ($\bar{x} \pm s$)
Hx	73,34 \pm 6,94
AcOEt	99,00 \pm 7,89
MeOH	30,49 \pm 3,32
MeOH:H ₂ O (1:1)	26,21 \pm 4,19

Fonte: AUTOR

Batista *et al.* (2017) reportaram CFT, expresso em mg EAG/g, de 19 para *A. platensis*, de 9,2 para *Tetraselmis suecica*, de 8,4 para *Phaeodactylum tricorutum* e de 6,4 para *Chlorella vulgaris*. Estes autores realizaram a extração utilizando solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e água), unindo o sobrenadante de cada extração para realizar uma única análise de CFT. Por sua vez, Bolanho *et al.* (2014) relataram valores de CFT para a biomassa de *A. platensis* de 12 mg EAG/g.

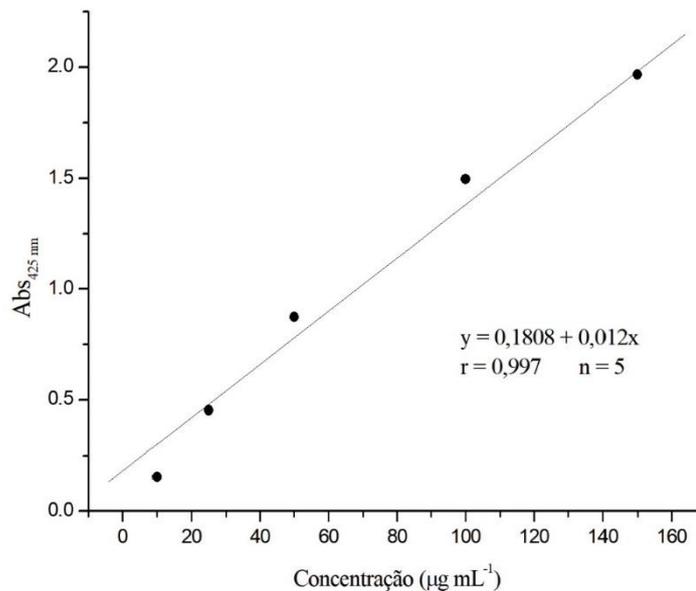
Machu *et al.* (2015) encontraram CFT no extrato aquoso de *A. platensis* de 43,2 mg EAG/g. Michael *et al.* (2018) encontraram CFT de 292, 17 e 409,20 mg EAG/g de biomassa seca de *A. fusiformes*, cultivada tanto no meio padrão Zarrouk, quanto em um meio de baixo custo desenvolvido pelos próprios autores, respectivamente. A extração foi feita com etanol a 95%, tendo o processo sido realizado três vezes para maximizar o rendimento do processo de extração e, conseqüentemente, os resultados de CFT.

Os resultados de CFT encontrados no presente trabalho estão dentro do amplo intervalo de variação relatado na literatura para microalgas.

4.3 Quantificação do teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF) nos extratos da microalga *Arthrospira platensis*

A curva padrão da quercetina (33.795-1 Aldrich) em concentrações de 10 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi utilizada para quantificar o teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF) nos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) de *A. platensis* (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 - Curva padrão da quercetina (33.795-1 Aldrich) em concentrações de 10 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTOR

Novamente foi evidenciado que os solventes tiveram efeito sobre a extração dos flavonoides (TABELA 2). Da mesma forma, os extratos Hx e AcOEt apresentaram os maiores rendimentos na extração dos flavonoides (318,15 e 474,65 mg EQ g^{-1} extrato, respectivamente),

enquanto que o extrato MeOH apresentou rendimento inferior (73,05 mg EQ g⁻¹ extrato). No extrato MeOH:H₂O (1:1), mesmo na maior concentração (1.000 µg mL⁻¹), os flavonoides não foram detectados ou por estarem ausentes ou por causa da concentração do extrato que deveria ter sido mais elevada.

Tabela 2 – Teor de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF), expressos em mg de equivalente quercetina (EQ) por g dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*.

Extratos	TF (mg EQ g ⁻¹ extrato) ($\bar{x} \pm s$)
Hx	318,15 ± 6,05
AcOEt	474,65 ± 6,15
MeOH	73,05 ± 1,94
MeOH:H ₂ O (1:1)	-

Fonte: AUTOR

A extração dos flavonoides é dependente da polaridade do solvente usado. Há um consenso de que os flavonoides são geralmente mais solúveis em solventes orgânicos polares (WANG; JÓNSDÓTTIR; ÓLAFSDÓTTIR, 2009), contudo, no presente trabalho, foi encontrado elevado teor de fenólicos em um solvente apolar (Hx) e em um solvente de polaridade moderada (AcOEt).

A variação do rendimento das extrações novamente pode ser explicada pelas diferentes polaridades dos flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) que foram seletivamente mais solúveis em diferentes solventes (NGO *et al.*, 2017). É importante destacar que as extrações foram feitas de forma sequencial e os extratos Hx e AcOEt apresentaram altos rendimentos (TABELA 2), enquanto que a disponibilidade dos flavonoides para a extração pelo metanol pode ter sido reduzida. Este solvente, aparentemente, foi capaz de remover todos os fenólicos polares, não restando compostos fenólicos para extração pelo MeOH:H₂O (1:1). Além disso, este resultado mostrou que nenhum solvente é capaz de retirar todos os flavonoides, evidenciando a grande variedade de polaridade desses compostos.

Michael *et al.* (2018) encontraram valores de TF de 11,25 e 13,25 mg RE/g de biomassa seca de *A. fusiformes* cultivadas no meio padrão Zarrouk e em um meio de baixo custo desenvolvido pelos próprios autores, respectivamente. A extração foi feita com etanol a 95%, tendo o processo de extração sido realizado três vezes para maximizar seu rendimento e, consequentemente, os resultados de TF.

4.4 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

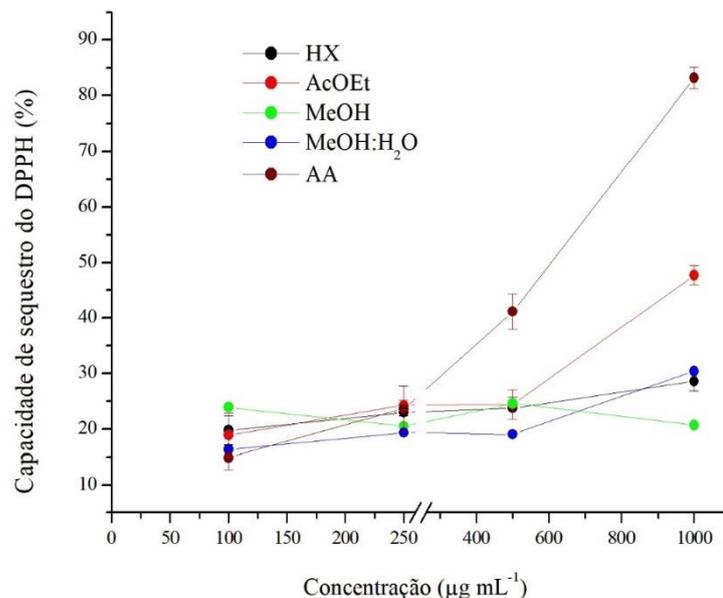
Os resultados da capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) da microalga *A. platensis* estão acompanhados daqueles obtidos para o controle positivo (ácido ascórbico) (TABELA 3, GRÁFICO 4).

Tabela 3 - Capacidade de sequestro do DPPH do ácido ascórbico (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações de 100 a 1.000 µg mL⁻¹.

Concentração (µg mL ⁻¹)	DPPH (%) ($\bar{x} \pm s$)				
	Ácido ascórbico	Hx	AcOEt	MeOH	MeOH:H ₂ O (1:1)
100	14,9 ± 2,2	19,8 ± 2,6	18,9 ± 3,9	23,9 ± 0,1	16,3 ± 0,0
250	23,6 ± 4,1	23,0 ± 0,6	24,3 ± 0,9	20,5 ± 0,1	19,3 ± 0,0
500	41,1 ± 3,2	23,8 ± 2,0	24,4 ± 2,7	24,6 ± 0,1	19,0 ± 0,0
1.000	83,2 ± 2,0	28,6 ± 1,7	47,7 ± 1,8	20,7 ± 0,0	30,1 ± 0,1

Fonte: AUTOR

Gráfico 4 – Capacidade de sequestro do DPPH do ácido ascórbico (AA, controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações de 100 a 1.000 µg mL⁻¹.



Fonte: AUTOR

É possível observar que na concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, os extratos Hx, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) apresentaram capacidade de sequestro do radical DPPH entre 20,7% e 30,1%, enquanto que o extrato AcOEt apresentou 47,7%, uma atividade semelhante àquela encontrada para o controle positivo (ácido ascórbico) na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TABELA 3).

A capacidade de sequestro do DPPH, um radical livre estável que contém nitrogênio, é um dos métodos mais comuns para determinar a atividade antioxidante por causa da elevada estabilidade na condução do experimento e da facilidade de execução da análise (TANG *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2017). Este método avalia a capacidade antioxidante; as espécies antioxidantes testadas eliminam o DPPH, cuja absorbância máxima ocorre em 515 nm, resultando na diminuição dessa absorbância. Nesse método, o DPPH é posto em excesso, de três a dez vezes mais em relação à amostra testada. Após o período de incubação, o DPPH residual é quantificado pela determinação da absorbância em 515 nm (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012; YANG *et al.*, 2017). Então uma menor leitura da absorbância indica que o extrato apresenta uma alta capacidade de sequestro do radical DPPH. A capacidade de sequestro do radical DPPH é feita com base na capacidade de redução do antioxidante o qual serve como doador de hidrogênio em tal caso (CEPOI *et al.*, 2009).

Michael *et al.* (2018) encontraram DPPH variando entre 72% e 95% para os extratos de *A. fusiformis* na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sengupta *et al.* (2018) reportaram DPPH de 40,26% no extrato de *A. platensis*, enquanto Cepoi *et al.* (2009) relataram DPPH nos extratos etanólicos a 40% e a 70% de *A. platensis* iguais a 30% e 52%, respectivamente, resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

Ali *et al.* (2014) fizeram uma extração sequencial da biomassa de *A. platensis* usando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol a 70% e água ($225 \mu\text{g mL}^{-1}$), determinaram a atividade de sequestro do DPPH e observaram que os extratos apresentaram atividades mais ou menos semelhantes, em torno de 47%.

A presença de compostos bioativos na biomassa de *A. platensis* pode estar associada ao potencial antioxidante, dentre outras funções biológicas.

Shanab *et al.* (2012) relataram que o cultivo de espécies de cianobactérias (*Nostoc muscorum*, *Oscillatoria* sp. e *A. platensis*), sob condições de estresse de nitrogênio, provocou um aumento considerável das ficobiliproteínas, seguido por um aumento em suas atividades antioxidantes.

Siriwardhana *et al.* (2003) reportaram uma alta correlação entre a capacidade de sequestro do radical DPPH e o conteúdo fenólico total.

Comparadas com outras microalgas, as cianobactérias como *A. platensis* possuem capacidade antioxidante graças à alta quantidade de ficobiliproteínas, especialmente a ficocianina (FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014), e aos compostos fenólicos, incluindo fenois simples, flavonoides, fenilpropanoides, taninos, ligninas, ácidos fenólicos e seus derivados, sintetizados como metabólitos secundários (EL-BAKY; EL BAZ; EL-BAROTY, 2009), os quais são considerados como uma das classes mais importantes de antioxidantes naturais (BATISTA *et al.*, 2017).

4.5 Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC)

Na determinação da atividade antioxidante por meio da capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC), a ferrozina forma um complexo (quelato) com íons ferrosos (Fe^{2+}), resultando em uma coloração rósea. Porém, esta reação é restringida na presença de agentes quelantes, resultando na diminuição da intensidade da coloração rósea do complexo ferrozina- Fe^{2+} . A perda da cor determina a capacidade de quelação da amostra (extrato) por competir com a ferrozina pelos íons ferrosos (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Assim, menores leituras de absorvância indicam que o extrato apresenta alta capacidade de quelação de Fe^{2+} .

Os resultados de FIC dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) da microalga *A. platensis* estão acompanhados daqueles obtidos para o controle positivo (EDTA) (TABELA 4, GRÁFICO 5). As atividades antioxidantes dos extratos de *A. platensis* são baixas em comparação com o controle positivo (EDTA), mas é possível observar que nas concentrações mais altas (250 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato MeOH:H₂O (1:1), os valores de FIC ficaram entre 45,2% e 55,2% (TABELA 4, GRÁFICO 5).

Em todas as concentrações testadas, os extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) de *A. platensis* interferiram na formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina, sugerindo que eles são possuidores de atividade quelante. No geral, a atividade medida pelo FIC foi considerada dependente da concentração e aumentou com o aumento da concentração do extrato (TABELA 4; GRÁFICO 5).

Extratos que apresentam capacidade de quelação de íons ferrosos podem atuar como antioxidantes à medida que eles formam complexos com os íons metálicos e reduzem o potencial redox, estabilizando a forma oxidada dos íons metálicos (HASSOUANI *et al.*, 2017). Por essa razão, o FIC da microalga *A. platensis* investigada no presente trabalho foi estimada pela ruptura do complexo Fe^{2+} -ferrozina.

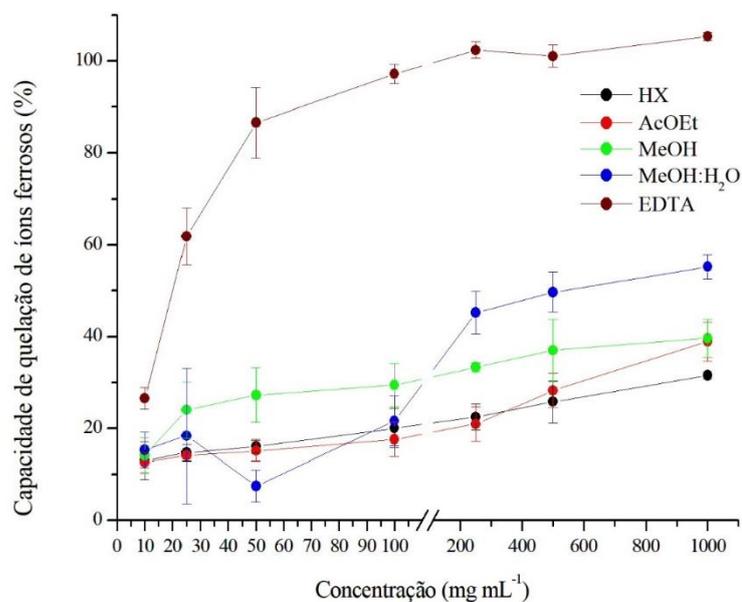
Hassouani *et al.* (2017) relataram FIC superior a 80% para os extratos da cianobactéria *Lyngbya aestuarii* preparados com diclorometano/metanol na concentração de 500 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4 – Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC) do EDTA (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 10 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FIC (%) ($\bar{x} \pm s$)				
	EDTA	Hx	AcOEt	MeOH	MeOH:H ₂ O (1:1)
10	26,5 \pm 2,4	13,0 \pm 4,1	12,6 \pm 2,0	14,1 \pm 3,9	15,3 \pm 3,8
25	61,9 \pm 6,2	14,7 \pm 1,8	14,1 \pm 0,5	24,0 \pm 6,2	18,4 \pm 14,3
50	86,6 \pm 7,6	16,1 \pm 1,5	15,1 \pm 2,2	27,2 \pm 6,0	7,5 \pm 3,5
100	97,2 \pm 2,1	20,0 \pm 4,2	17,6 \pm 3,8	29,4 \pm 4,8	21,6 \pm 5,5
250	102,4 \pm 1,8	22,4 \pm 2,8	20,9 \pm 3,7	33,3 \pm 1,0	45,2 \pm 4,7
500	101,1 \pm 2,3	25,8 \pm 4,5	28,2 \pm 3,7	37,0 \pm 6,8	49,7 \pm 4,4
1.000	105,4 \pm 1,0	31,5 \pm 0,7	39,0 \pm 4,2	39,6 \pm 4,2	55,2 \pm 2,7

Fonte: AUTOR

Gráfico 5 – Capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC) do EDTA (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTOR

4.6 Poder de redução de íons férricos (FRAP)

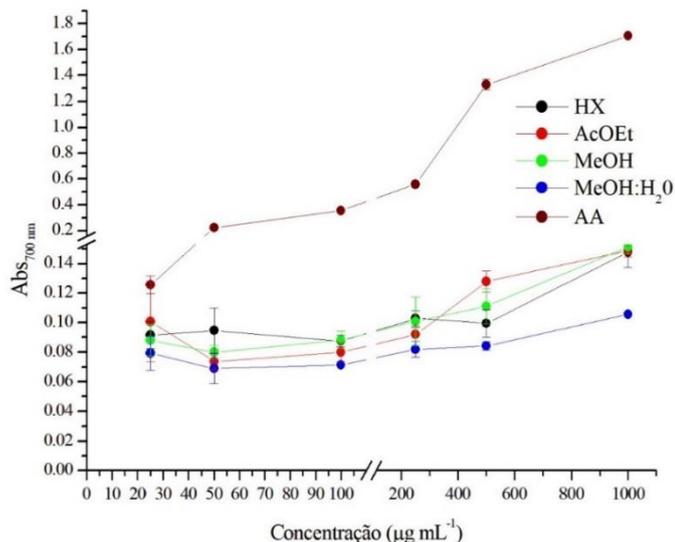
Os resultados do poder de redução de íons férricos (FRAP) dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) da microalga *A. platensis* estão acompanhados daqueles obtidos para o controle positivo (ácido ascórbico) (TABELA 5, GRÁFICO 6). Neste trabalho, todos os extratos testados apresentaram baixa atividade antioxidante pelo método FRAP.

Tabela 5 – Poder de redução de íons férricos (FRAP) do ácido ascórbico (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 25 a 1.000 µg mL⁻¹.

Concentração (µg mL ⁻¹)	Poder de redução de íons férricos (Abs _{700 nm})				
	Ácido ascórbico	Hx	AcOEt	MeOH	MeOH:H ₂ O (1:1)
25	0,126 ± 0,006	0,092 ± 0,009	0,101 ± 0,027	0,088 ± 0,011	0,079 ± 0,012
50	0,225 ± 0,009	0,095 ± 0,015	0,074 ± 0,006	0,080 ± 0,004	0,069 ± 0,010
100	0,356 ± 0,016	0,088 ± 0,004	0,080 ± 0,007	0,088 ± 0,006	0,071 ± 0,001
250	0,559 ± 0,003	0,103 ± 0,005	0,092 ± 0,005	0,101 ± 0,016	0,082 ± 0,005
500	1,329 ± 0,041	0,100 ± 0,009	0,128 ± 0,007	0,111 ± 0,012	0,084 ± 0,003
1.000	1,707 ± 0,014	0,148 ± 0,010	0,149 ± 0,004	0,152 ± 0,005	0,106 ± 0,001

Fonte: AUTOR

Gráfico 6 – Poder de redução de íons férricos (FRAP) do ácido ascórbico (AA, controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 25 a 1.000 µg mL⁻¹.



Fonte: AUTOR

Batista *et al.* (2017) avaliaram o FRAP, expresso em mmol TEAC kg⁻¹, de quatro cepas de microalgas: *A. platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Tetraselmis suecica* e *Phaeodactylum tricornutum*, tendo encontrado maior capacidade antioxidante na biomassa de *P. tricornutum* (248), seguida da de *C. vulgaris* (193) e das de *A. platensis* e *T. suecica* (cerca de 160).

Golmakani *et al.* (2018) reportaram FRAP dos extratos de *A. platensis* de 12,06 AAE mL⁻¹. Sengupta *et al.* (2018), também estudando a mesma microalga, encontraram valores de FRAP muito inferiores (0,20 µg g⁻¹). A comparação desses resultados com os do presente trabalho é dificultada pelo fato de estarem expressos em unidades diferentes.

4.7 Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB)

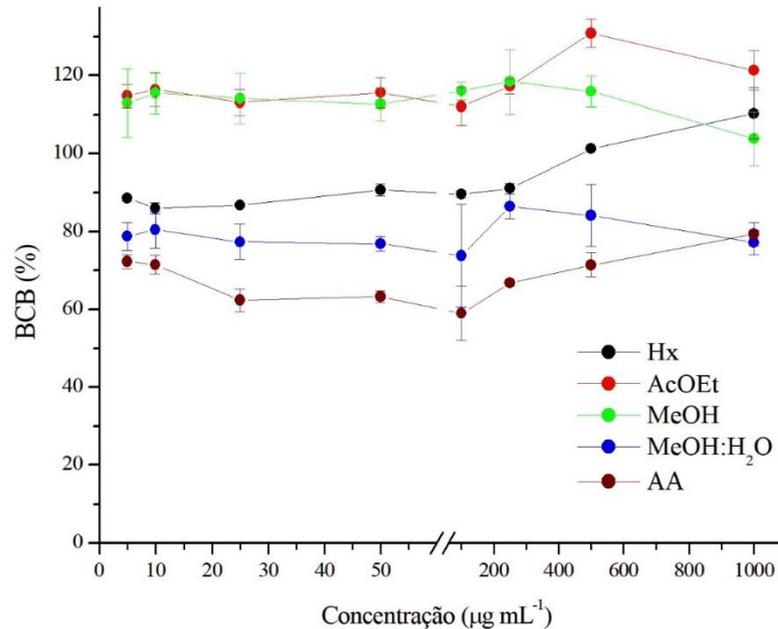
Os resultados da atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB) dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) da microalga *A. platensis* estão acompanhados daqueles obtidos para o controle positivo (ácido ascórbico) (TABELA 6, GRÁFICO 7).

Tabela 6 – Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB) (média ± desvio padrão) do ácido ascórbico (controle positivo) e dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações de 5 a 1.000 µg mL⁻¹, após 300 minutos.

Concentração (µg mL ⁻¹)	BCB (%) ($\bar{x} \pm s$)				
	Ácido ascórbico	Hx	AcOEt	MeOH	MeOH:H ₂ O (1:1)
5	72,3 ± 1,9	88,6 ± 0,8	114,8 ± 2,9	112,9 ± 8,8	78,8 ± 3,6
10	71,5 ± 2,4	86,0 ± 1,4	116,4 ± 4,4	115,4 ± 5,1	80,5 ± 4,7
25	62,3 ± 2,9	86,8 ± 0,6	113,1 ± 3,3	114,1 ± 6,4	77,3 ± 4,5
50	63,3 ± 1,5	90,7 ± 1,5	115,6 ± 3,8	112,7 ± 4,2	76,8 ± 1,9
100	59,0 ± 7,0	89,6 ± 0,8	112,1 ± 4,8	116,0 ± 2,3	73,8 ± 13,2
250	66,8 ± 0,8	91,1 ± 1,4	117,2 ± 2,0	118,4 ± 8,3	86,5 ± 3,2
500	71,4 ± 3,1	101,4 ± 0,4	130,9 ± 3,6	115,9 ± 4,0	84,1 ± 8,0
1.000	79,4 ± 3,1	110,3 ± 6,5	121,3 ± 5,0	103,9 ± 6,9	77,2 ± 3,1

Fonte: AUTOR

Gráfico 7 – Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) (média \pm desvio padrão) do ácido ascórbico (AA, controle positivo) e dos dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações de 5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após 300 minutos.



Fonte: AUTOR

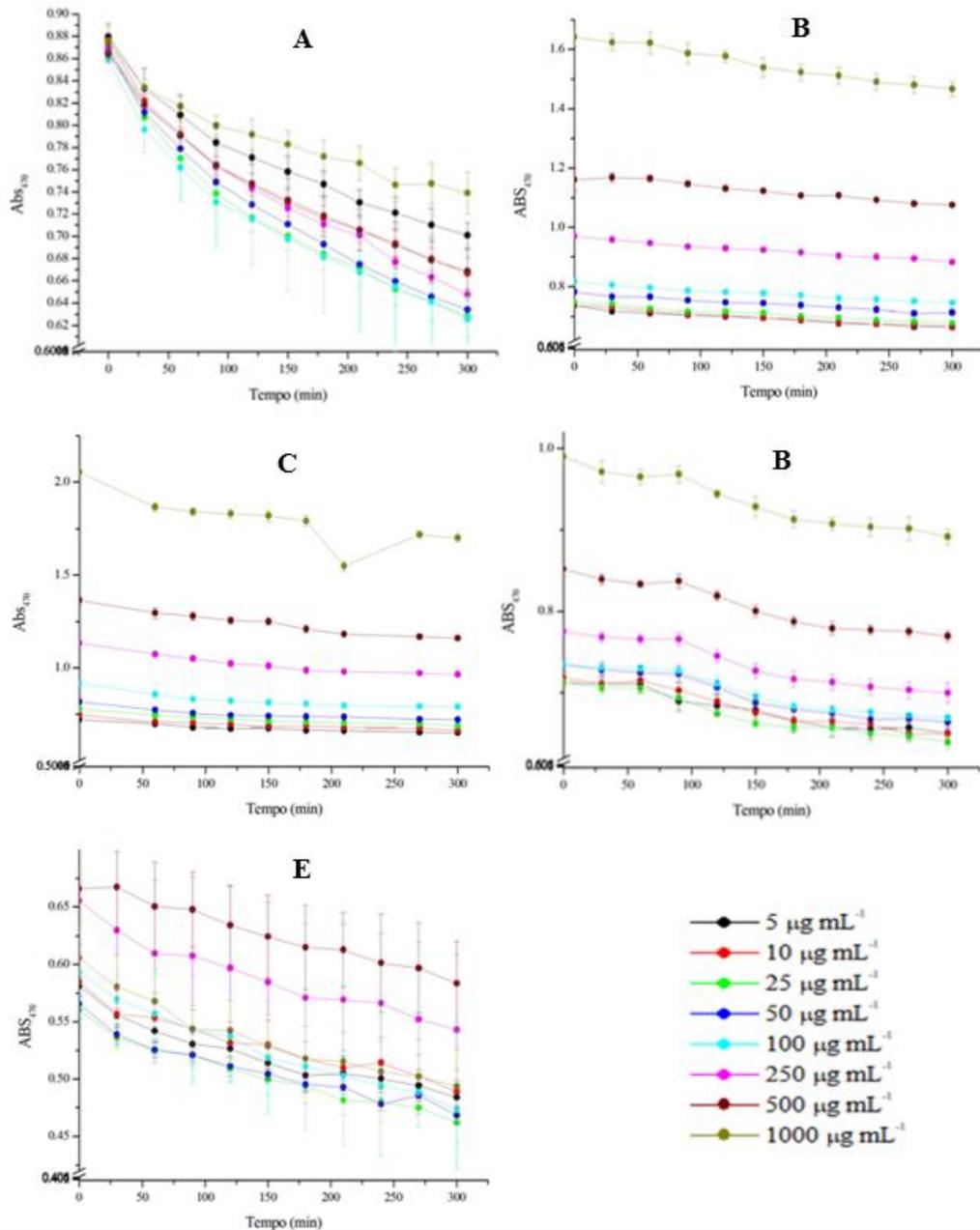
O impacto dos solventes sobre o BCB de *A. platensis* no presente trabalho pode ser explicado pela variação dos grupos bioativos extraídos pelos diferentes solventes, cada um contribuindo com uma atividade antioxidante diferente (NGO *et al.*, 2017).

Ali *et al.* (2014) realizaram uma extração da biomassa de *A. platensis* de forma sequencial, usando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol a 70% e água (225 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e analisaram a atividade antioxidante pelo BCB. Os autores observaram que o extrato acetato de etila apresentou a maior atividade antioxidante (93,64%), melhor resultado encontrado também no presente trabalho, enquanto que os extratos hexano e clorofórmio apresentaram atividade moderada (73,36% e 76,77%, respectivamente).

Gargouri, Magné e El Feki (2016) encontraram uma forte atividade de inibição do branqueamento do β -caroteno ($\text{IC}_{50} = 4,01 \mu\text{g mL}^{-1}$), resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho para BCB.

As reduções da atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) do controle positivo (ácido ascórbico) e dos extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) da microalga *A. platensis*, medidas a cada 30 min, no intervalo de 0 a 300 min, duração total da determinação, estão mostradas nos GRÁFICOS 8A a 8E.

Gráfico 8 – Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) (média \pm desvio padrão), de 0 a 300 min, medidas a cada 30 minutos, do ácido ascórbico (controle positivo - A) e dos extratos hexano (Hx - B), acetato de etila (AcOEt - C), metanol (MeOH - D) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1 - E) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações de 5 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTOR

Em todas as concentrações testadas, os extratos de *A. platensis* interferiram no branqueamento do β -caroteno, sugerindo atividade antioxidante. O extrato AcOEt apresentou o melhor BCB (TABELA 6, GRÁFICOS 7 e 8). No geral, a atividade do BCB foi considerada dependente da concentração e aumentou com o aumento da concentração do extrato (GRÁFICOS 8A a 8E).

Estudos revelaram que vários gêneros de microalgas, incluindo *Arthrospira*, contêm potentes antioxidantes, tanto nos extratos lipofílicos quanto naqueles hidrofílicos (ALI *et al.*, 2014; ROMAY *et al.*, 2003). Ao usar extratos brutos de cianobactérias como fonte de antioxidantes naturais, não apenas compostos fenólicos, mas também outros compostos devem ser considerados. Da mesma forma, os carotenoides cianobacterianos (α - e β -caroteno, licopeno, zeaxantina, luteína, echinenona, astaxantina e cantaxantina) apresentam importante atividade antioxidante contra radicais livres (HASSOUANI *et al.*, 2017). Além disso, outros compostos como ácidos graxos poli-insaturados e polissacarídeos também podem desempenhar um papel importante na atividade de eliminação de radicais (PARWANI *et al.*, 2017). Resumindo, como as cianobactérias são matrizes complexas de vários compostos, a atividade antioxidante não estaria intimamente ligada a um composto específico, mas a sistemas antioxidantes multicomponentes, que são geralmente mais eficazes devido a interações aditivas ou sinérgicas entre os diferentes componentes antioxidantes (BABIĆ *et al.*, 2016; HASSOUANI *et al.*, 2017).

4.8 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os compostos fenólicos, carotenoides, peptídeos e outras substâncias presentes nos extratos de microalgas são conhecidos por serem responsáveis por suas propriedades antimicrobianas (PAGNUSSATT *et al.*, 2014; PALIWAL *et al.*, 2016; SCAGLIONI; DE OLIVEIRA-GARCIA; BADIALE-FURLONG, 2018).

Os resultados da CIM contra as cepas-padrão *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* ser. Braenderup (LAMAP18) e dos controles positivo e negativo estão apresentados nas FIGURAS 2, 3 e 4.

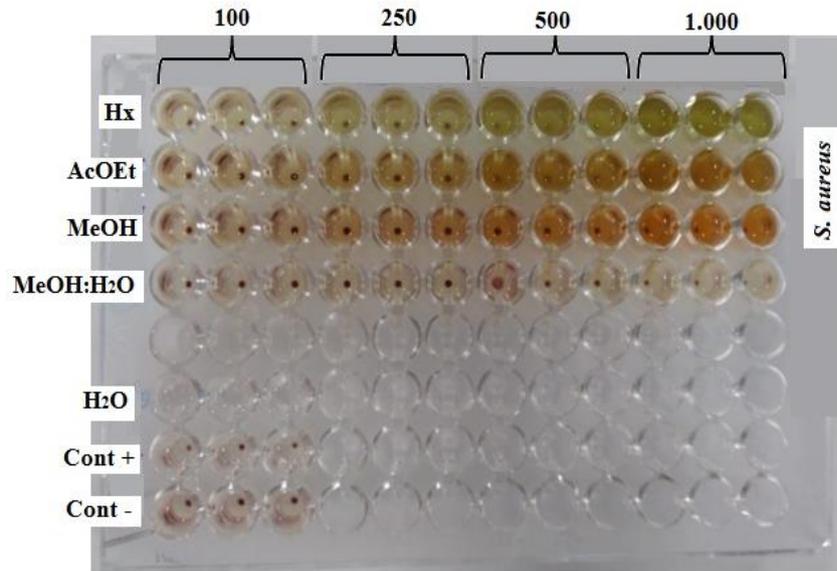
Com relação ao *S. aureus*, que é uma bactéria Gram-positiva, os extratos não foram capazes de inibir seu crescimento, nem mesmo na maior concentração testada ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) (FIGURA 2).

Os resultados da CIM contra as cepas-padrão *E. coli* e *Salmonella* ser. Braenderup também foram negativos, ou seja, os extratos, do mesmo modo, não foram capazes de inibir o crescimento dessas bactérias Gram-negativas (FIGURAS 3 e 4).

Apesar dos resultados negativos quanto à atividade antibacteriana, compostos ativos contra bactérias Gram-negativas são muito importantes tendo em vista que, geralmente, os antibióticos são menos efetivos contra elas, por causa da complexidade de sua estrutura

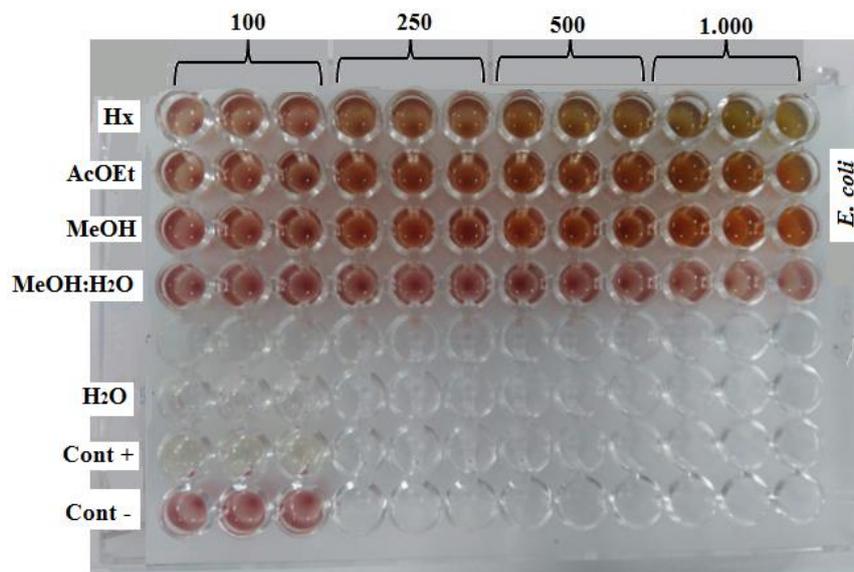
multicamada da parede celular contendo lipopolissacarídeos na parte mais externa da superfície celular, o que dificulta a penetração do composto ativo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016).

Figura 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100, 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, frente a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



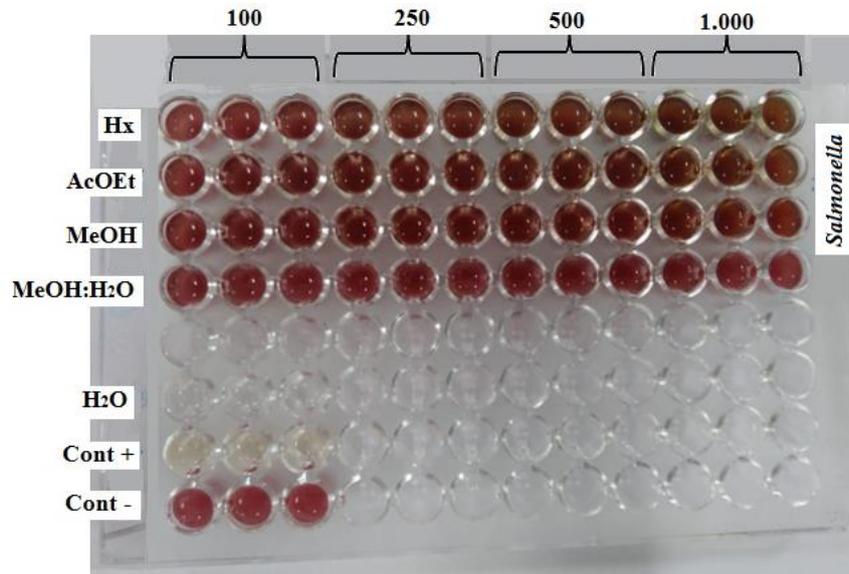
Fonte: AUTOR

Figura 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100, 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, frente a cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922).



Fonte: AUTOR

Figura 4 – Conconcentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100, 250, 500 e 1.000 µg mL⁻¹, frente a cepa *Salmonella* ser. Braenderup (LAMAP18).



Fonte: AUTOR

Embora os extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) da microalga *A. platensis* não tenham apresentado atividade inibitória contra as bactérias testadas, foi observada uma redução da carga bacteriana do extrato Hx de 100 para 1.000 µg mL⁻¹, o que indica uma possível atividade bacteriostática desse extrato (FIGURA 5).

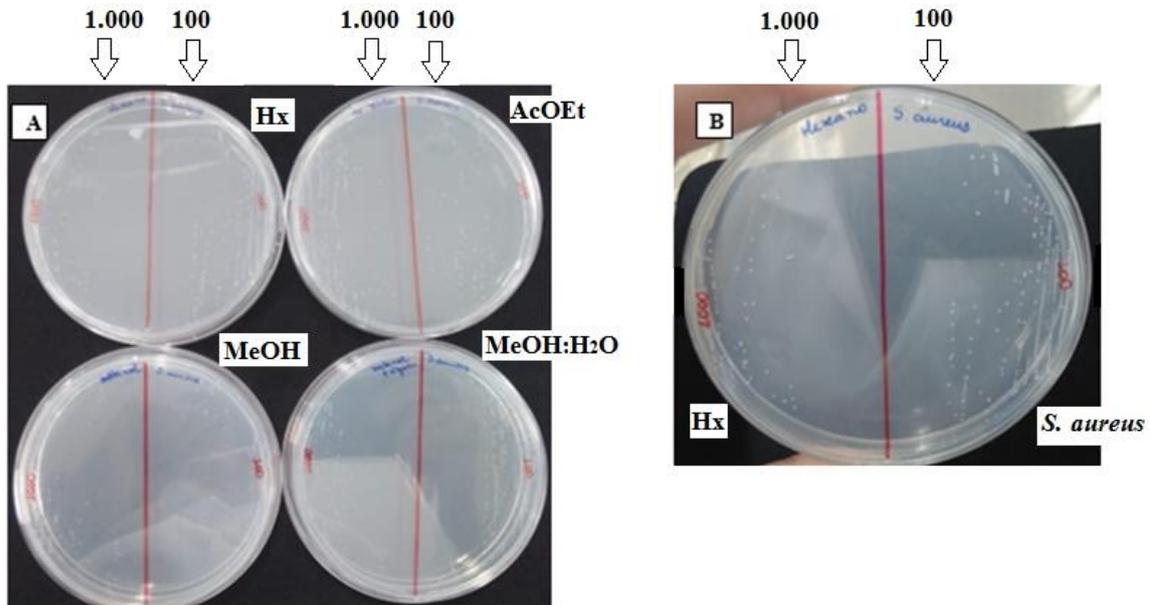
Fu, Lu e Zhou (2016) demonstraram que o ácido gálico apresentou atividade antibacteriana contra oito cepas bacterianas. Lima *et al.* (2016) também testaram a atividade antibacteriana dos ácidos gálico e cafeico contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e obtiveram potencial inibição do crescimento dessas cepas.

Os ácidos fenólicos, como gálico e cafeico, afetam a membrana celular microbiana, alterando a carga e a hidrofobicidade da superfície celular (BORGES *et al.*, 2013; PAGNUSSATT *et al.*, 2016).

Alguns autores relataram que determinados ácidos graxos apresentam alguma atividade antimicrobiana, especificamente os ácidos láurico, palmitoleico, oleico e, principalmente, o ácido γ -linolênico (DE MULE, 1996; MENDIOLA *et al.*, 2007).

Os extratos Hx, AcEot, MeOH e MeOH:H₂O (1:1), avaliados neste trabalho, não apresentaram qualquer tipo de atividade contra as bactérias analisadas, provavelmente devido ao fato de os compostos que promovem a ação antimicrobiana estarem em uma concentração insuficiente para auferir tal atividade.

Figura 5 – Verificação da atividade bacteriostática dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 e 1.000 µg mL⁻¹ (A). Verificação da atividade bacteriostática do extrato hexano (Hx) na concentração 1.000 µg mL⁻¹ frente à cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) na concentração 100 µg mL⁻¹ (B).



Fonte: AUTOR

4.9 Atividade antifúngica

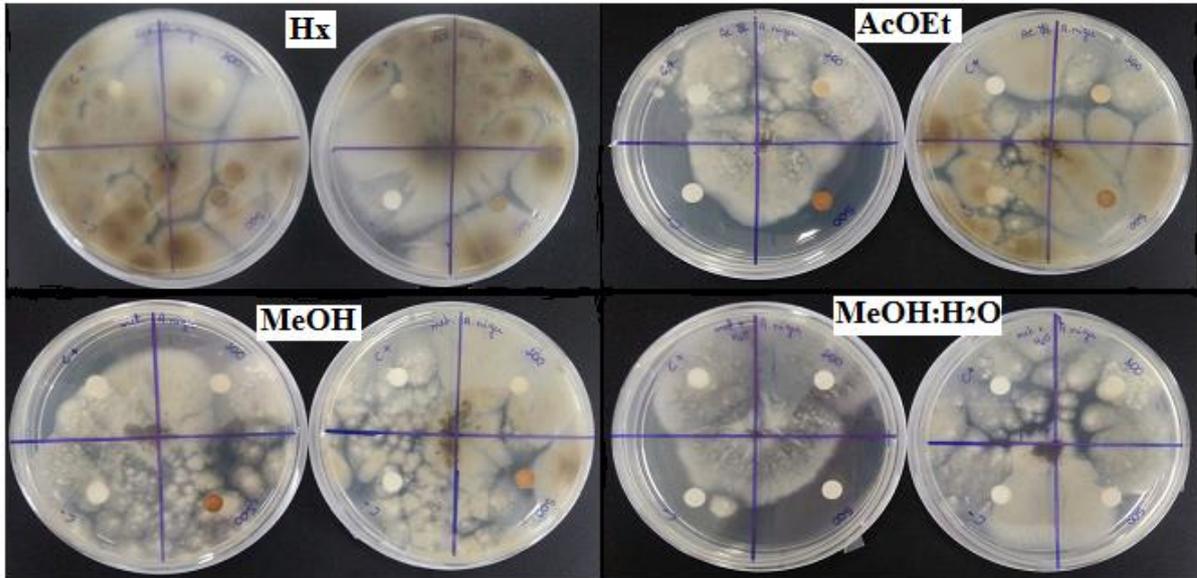
Foi possível constatar a inexistência de atividade fungicida dos extratos testados neste trabalho. Entretanto, foi observada uma demora ou retardamento no crescimento de *A. niger* nos discos embebidos com o extrato AcOEt. Primeiramente o fungo cresceu de forma mais lenta ao redor dos discos e depois por cima deles, evidenciando uma provável ação fungistática (FIGURA 6).

Não foi possível demonstrar atividade antifúngica contra *Candida albicans* (FIGURA 7).

Alguns estudos comprovaram efeitos antifúngico e antimicotoxigênico de compostos fenólicos extraídos de microalgas (PAGNUSSATT *et al.*, 2014; SCAGLIONI; BADIALE-FURLONG, 2017; SCAGLIONI; DE OLIVEIRA-GARCIA; BADIALE-FURLONG, 2018; SOUZA *et al.*, 2011).

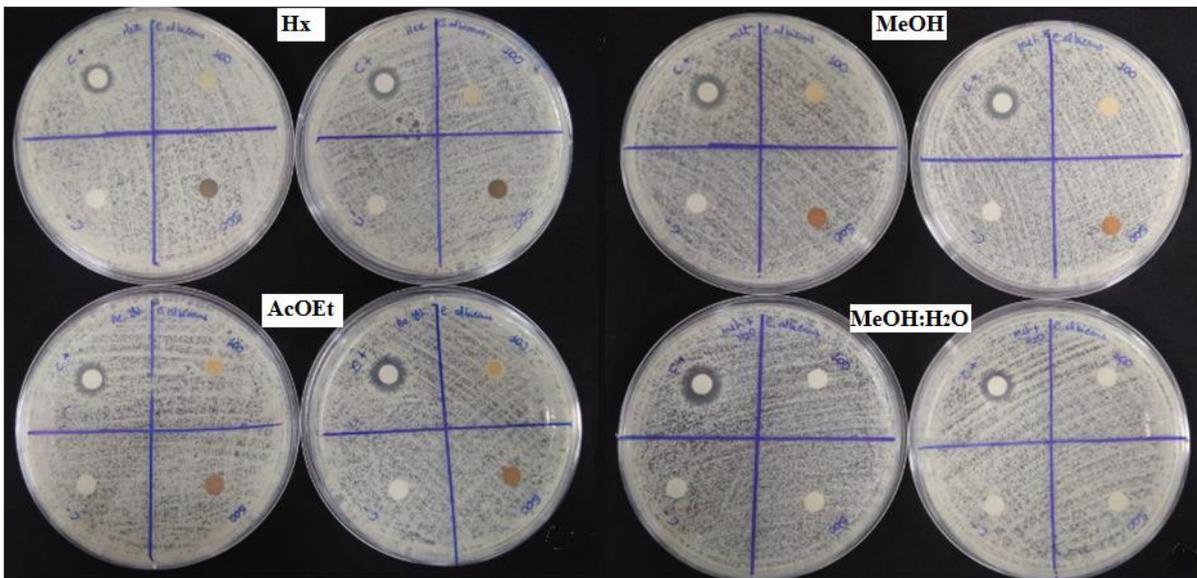
Pagnussatt *et al.* (2016) e Souza *et al.* (2011) demonstraram a capacidade antifúngica de extratos de *Arthrospira* sp. e *Chlorella* sp. contra espécies dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, respectivamente.

Figura 6 – Verificação da atividade antifúngica dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1), em duplicata, da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 e 500 µg mL⁻¹, frente ao fungo *Aspergillus niger*.



Fonte: AUTOR

Figura 7 – Verificação da atividade antifúngica dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1), em duplicata, da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 e 500 µg mL⁻¹, frente ao fungo *Candida albicans*.



Fonte: AUTOR

Scaglioni, De Oliveira-Garcia e Badiale-Furlong (2018) encontraram eficiência média de inibição da produção de tricotecenos, um importante grupo de micotoxinas, de 82% e 68% após tratamento com extratos fenólicos de *Nannochloropsis* sp. e *Arthrospira* sp.,

respectivamente. Em comparação, o tebuconazol, um antifúngico sintético, foi menos eficiente na prevenção da produção de tricotecenos (12%). Além disso, os extratos das microalgas foram capazes de inibir fortemente o crescimento de *Fusarium graminearum*, comprovando seu potencial antifúngico e antimicotoxigênico em culturas de trigo *in vitro*.

Durante o processo de extração ou purificação de compostos de interesse com aplicação pretendida, pode haver uma exposição destes a processos hidrolíticos ou oxidativos capazes de reduzir a atividade biológica como efeito antifúngico, antimicotoxina ou antimicrobiano (PAGNUSSATT *et al.*, 2016).

Estudos anteriores mostraram que os ácidos fenólicos, particularmente o ácido clorogênico, o qual está presente em *A. platensis*, estão associados ao efeito antifúngico (ATANASOVA-PENICHON; BARREAU; RICHARD-FORGET, 2016; SCAGLIONI; DE OLIVEIRA-GARCIA; BADIALE-FURLONG, 2018).

Nos discos embebidos com o extrato AcOEt do presente trabalho foi observado apenas um efeito fungistático contra *A. niger*. Com os demais extratos (Hx, MeOH e MeOH:H₂O 1:1), nenhum tipo de atividade antifúngica foi verificada; talvez os compostos associados com tal ação estivessem em uma concentração insuficiente para auferir atividade fungicida ou até mesmo fungistática.

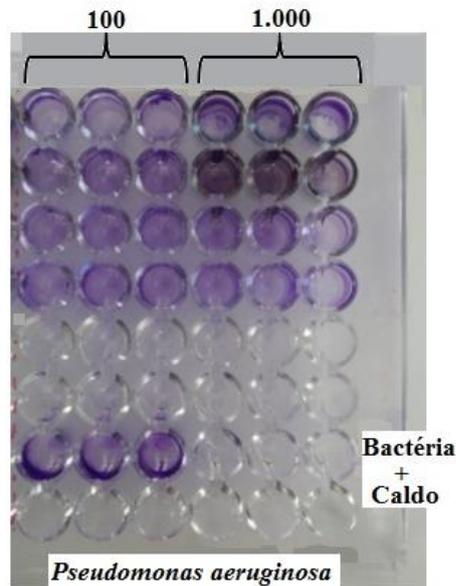
Novos estudos precisam ser realizados para determinar o mecanismo para inibir o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas, assim como as quantidades de compostos fenólicos necessárias para neutralizá-los, e para determinar a viabilidade de aplicação em escala comercial (SCAGLIONI; DE OLIVEIRA-GARCIA; BADIALE-FURLONG, 2018).

4.10 Atividade antibiofilme

Os extratos Hx, AcOEt, MeOH e MeOH:H₂O 1:1 de *A. platensis* não foram capazes de inibir a formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (FIGURA 8).

Os biofilmes podem ser formados por bactérias ou por associações delas com outros micro-organismos. As microcolônias podem ser formadas por células da mesma espécie ou de espécies distintas (ELIAS; BANIN, 2012), e funcionam como um escudo contra antibióticos ou contra algum estresse ambiental.

Figura 8 – Verificação da atividade antibiofilme dos extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) da microalga *Arthrospira platensis*, nas concentrações 100 e 1.000 µg mL⁻¹ frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).



Fonte: AUTOR.

Carvalho *et al.* (2017), analisando extratos brutos de seis espécies de macroalgas marinhas, *Canistrocarpus cervicornis*, *Sargassum vulgare*, *Colpomenia sinuosa*, *Padina* sp., *Spyridia aculeata* e *Pterocladia capillacea*, com ou sem a associação de microsimbiontes como fontes de compostos não-tóxicos capazes de impedir o processo de incrustação, verificaram inibição da formação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Segundo os autores, os extratos de *C. cervicornis* e *Padina* sp. com associação e os de *C. sinuosa* sem associação interferiram significativamente na agregação de *P. aeruginosa*.

Lewisoscar *et al.* (2017) relataram que o extrato metanólico de *A. platensis* na concentração de 100 ng mL⁻¹ foi testado frente a cepas bacterianas seletivas de importância clínica e apresentou baixa atividade antibiofilme.

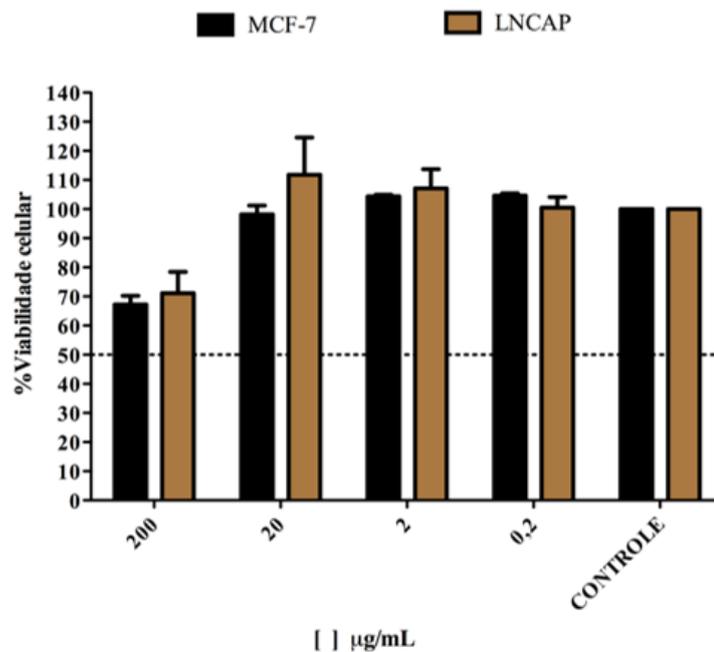
É importante encontrar compostos capazes de impedir a associação dos organismos em biofilmes, considerando que os biofilmes podem se formar em qualquer ambiente e em qualquer superfície, primeiramente se fixando e, em seguida, aderindo a ela como resultado da produção de uma matriz polissacarídica exopolimérica, responsável pela fraca penetração e difusão das drogas antimicrobianas (PANE *et al.*, 2015).

4.11 Atividade contra células de câncer

4.11.1 Efeito dos extratos da microalga *Arthrospira platensis* sobre a viabilidade celular

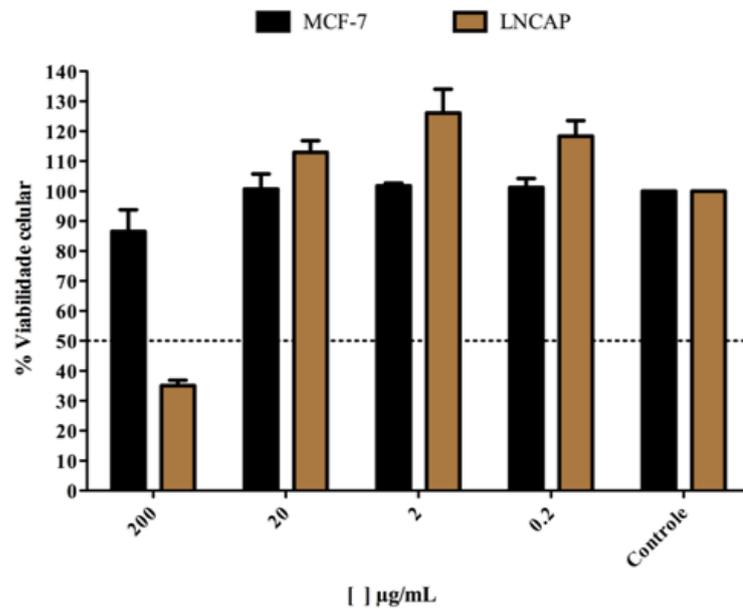
Para avaliar os efeitos dos extratos Hx, AcOEt e MeOH da microalga *A. platensis* sobre a viabilidade celular, linhagens celulares de MCF7 e LNCaP foram incubadas com doses crescentes dos extratos. O extrato MeOH:H₂O (1:1) não foi testado. Foi possível observar uma redução na viabilidade celular das células MCF7 e LNCaP para todos os extratos testados na concentração de 200 µg mL⁻¹ (GRÁFICOS 9, 10 e 11).

Gráfico 9 – Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com várias concentrações (0,2 a 200 µg mL⁻¹) do extrato hexano (Hx) da microalga *Arthrospira platensis*.



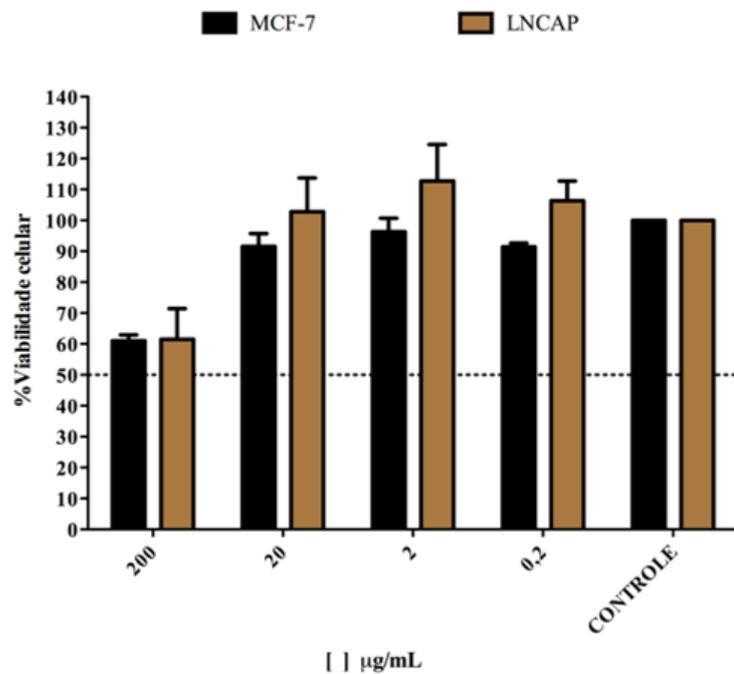
Fonte: AUTOR

Gráfico 10 – Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com várias concentrações (0,2 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato acetato de etila (AcOEt) da microalga *Arthrospira platensis*.



Fonte: Autor

Gráfico 11 – Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com várias concentrações (0,2 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato metanol (MeOH) da microalga *Arthrospira platensis*.



Fonte: AUTOR

O câncer é uma doença que afeta seriamente a saúde e a qualidade de vida dos seres humanos. A maioria dos estudos sobre a patogênese do câncer está concentrada na regulação

da proliferação das células cancerígenas. Quando essas células estão se proliferando fora de controle, elas podem invadir os tecidos normais adjacentes ou entrar no sistema circulatório ou no sistema linfático e se espalhar pelo corpo (LI *et al.*, 2015).

A inibição do crescimento da linhagem celular pode variar de acordo com o tipo de solvente, concentração do extrato ou composto e período de tratamento (HERNANDEZ; KHANDUAL; LÓPEZ, 2017).

Muitos agentes anticâncer são provenientes de micróbios, plantas, organismos marinhos e microalgas (DO NASCIMENTO-NETO, 2018; SHANAB *et al.*, 2012). Na literatura, a citotoxicidade de *A. platensis* é considerada um dos mecanismos de ação anticarcinogênica. Por exemplo, Czerwonka *et al.* (2018) demonstraram que o extrato aquoso de *A. platensis* comercial exerceu atividade citotóxica e antiproliferativa contra células de câncer de pulmão humano (linhagem A549), porém o extrato não apresentou atividade citotóxica contra fibroblastos da pele humana (HSF) normais. Já Shanab *et al.* (2012) examinaram a viabilidade celular de linhagens de células cancerígenas e encontraram que o extrato aquoso de *A. platensis* na concentração de 200 µg mL⁻¹ exibiu uma eficiência anticâncer moderada de 67% e 54,8%, respectivamente, contra o tumor ascítico de Ehrlich e contra o carcinoma hepatocelular humano. Os autores atribuíram os resultados ao conteúdo de ficobiliproteínas e à alta produção de metabólitos secundários de *A. platensis*.

Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho para os extratos Hx e MeOH, na mesma concentração (200 µg mL⁻¹). Entretanto, as células LNCaP tratadas com o extrato AcOEt apresentaram uma viabilidade anticâncer ainda mais eficiente (35,08%) (TABELA 7).

Tabela 7 – Avaliação da viabilidade celular das linhagens MCF7 e LNCaP tratadas com os extratos hexano (Hx), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) da microalga *Arthrospira platensis* na concentração de 200 µg mL⁻¹.

Linhagem celular	Viabilidade celular (%) ($\bar{x} \pm s$) dos extratos		
	Hx	AcOEt	MeOH
LNCaP	71,11 ± 7,31	35,08 ± 1,83	61,48 ± 9,93
MCF-7	67,29 ± 2,92	86,56 ± 7,22	60,98 ± 1,92

Fonte: AUTOR

Este fato demonstra que o efeito citotóxico do extrato de *A. platensis* sobre as células cancerígenas depende fortemente do tipo de célula cancerígena (CZERWONKA *et al.*, 2018).

Hernandez, Khandual e López, (2017) examinaram a viabilidade celular das linhagens de células da leucemia humana Kasumi-1 e K-562 frente aos extratos etanol a 70%, etanol absoluto e aquoso de *A. platensis*. As células cancerígenas foram expostas aos extratos por 72 h, e os pesquisadores observaram que, na concentração 6,25 mg mL⁻¹, o extrato etanol a 70% se mostrou mais eficiente apresentando uma viabilidade de 21,89% contra a linhagem Kasumi-1 e de 43,18% contra a linhagem K-562.

No presente trabalho, os extratos de *A. platensis* em concentrações inferiores a 100 µg mL⁻¹ não apresentaram efeito tóxico sobre as células cancerígenas MCF7 e LNCaP.

Deve-se considerar que no presente trabalho foi utilizado o extrato bruto e não compostos isolados, como a ficocianina ou o β-caroteno, por exemplo, e, mesmo assim, foi possível observar forte atividade no caso do extrato AcOEt para a linhagem LNCaP e atividade moderada para os demais extratos na concentração de 200 µg mL⁻¹. A elevada atividade anticarcinogênica do extrato AcOEt pode ser devido as altas quantidades de compostos fenólicos e flavonoides (TABELAS 1 e 2) e pela possível atividade sinérgica entre esses e outros compostos, como polissacarídeos, ficobiliproteínas e carotenoides (SHANAB *et al.*, 2014), os quais, em conjunto, parecem apresentar uma atividade anticarcinogênica mais intensa do que a atividade de cada composto isolado (HERNANDEZ; KHANDUAL; LÓPEZ, 2017).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que os compostos responsáveis pela atividade anticarcinogênica são de natureza polar e apolar, sendo, na sua maioria, extraídos por um solvente de polaridade moderada, o acetato de etila (TABELAS 1 e 2). Como a extração foi feita de forma sequencial e o acetato de etila apresentou grande capacidade de extração, a disponibilidade desses compostos para as extrações subsequentes por solventes de maior polaridade pode ter sido reduzida.

A microalga *A. platensis* contém ácidos fenólicos, tocoferol e vários pigmentos, como β-caroteno, clorofila e ficocianina, os quais são conhecidos por apresentarem atividade antioxidante (PAK *et al.*, 2012; RAVI *et al.*, 2010).

Li *et al.* (2015) demonstraram que a C-ficocianina, um componente natural da microalga *A. platensis*, foi capaz de inibir o crescimento de células cancerígenas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O efeito anticâncer da ficocianina pode ser atribuído à interferência na síntese do DNA das células cancerígenas (LIU *et al.*, 2016) ou à melhoria das funções imunológicas (HERNANDEZ; KHANDUAL; LÓPEZ, 2017; ZAID; HAMMAD; SHARAF, 2015).

Do Nascimento-Neto *et al.* (2018) demonstraram que uma lectina da esponja marinha *Haliclona caerulea* foi capaz de induzir a apoptose e a autofagia de células do câncer

de mama MCF-7. É necessário a realização de estudos para investigar se a microalga *A. platensis* também apresenta lectinas com essa atividade.

O β -caroteno é outro proeminente composto bioativo encontrado na microalga *A. platensis*. As células cancerígenas normalmente não são capazes de receber sinais químicos de controle de crescimento provenientes de outras células. O β -caroteno abre os canais de comunicação da membrana das células cancerosas e pré-cancerosas, permitindo o recebimento do sinal para interromper a divisão celular. Por isso, os alimentos ricos em carotenoides, dentre eles o β -caroteno, são capazes de prevenir o câncer (HERNANDEZ; KHANDUAL; LÓPEZ, 2017; SHETE; QUADRO, 2013).

Em resumo, os extratos Hx e MeOH apresentaram atividade anticarcinogênica moderada contra as linhagens MCF7 e LNCaP, enquanto o extrato AcOEt apresentou atividade moderada contra MCF7 e atividade forte contra LNCaP, mostrando que ele claramente apresenta intensa atividade citotóxica.

O extrato AcOEt pode funcionar como um novo tipo de agente terapêutico podendo ser utilizado para desenvolvimento de novos fármacos no futuro. De qualquer forma, é necessário que se desenvolvam mais estudos para viabilizar este pensamento.

5 CONCLUSÕES

A extração sequencial da biomassa da microalga *Arthrospira platensis* em hexano (Hx), acetato de etila (AcEOt), metanol (MeOH) e metanol:água 1:1 (MeOH:H₂O 1:1) favoreceu a extração de compostos fenólicos totais (CFT) e de flavonoides (flavonois e flavonas do subgrupo luteolina) (TF) com os solventes menos polares, diminuindo a quantidade extraída nos solventes de maior polaridade.

As atividades antioxidantes *in vitro*, medidas pela capacidade de sequestro do radical DPPH, capacidade de quelação de íons ferrosos (FIC) e atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) foram mais elevadas no extrato AcOEt, enquanto que o poder de redução de íons férricos (FRAP) foi maior no extrato MeOH:H₂O (1:1).

Os extratos Hx, AcEOt, MeOH e MeOH:H₂O (1:1) não apresentaram atividade inibitória contra os fungos e as bactérias testadas, contudo foi observada uma redução da carga bacteriana do extrato Hx frente à bactéria *Staphylococcus aureus*, o que mostra uma possível atividade bacteriostática desse extrato. Além disso, no teste antifúngico foi observado que houve uma demora ou retardamento no crescimento de *Aspergillus niger* nos discos embebidos com o extrato AcOEt, evidenciando uma possível atividade fungistática. Os extratos testados não apresentaram atividade antibiofilme.

O presente trabalho sugere que os extratos brutos da microalga *A. platensis*, obtidos com os solventes Hx, AcOEt e MeOH podem ser usados eficazmente no controle do crescimento das linhagens das células cancerígenas MCF7 e LNCaP. Porém são necessários novos estudos para identificar os compostos bioativos presentes nos extratos de *A. platensis*, especialmente no extrato AcOEt.

REFERÊNCIAS

- AARON, S. D.; FERRIS, W.; RAMOTAR, K.; VANDEMHEEN, K.; CHAN, F.; SAGINUR, R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4172-4179, 2002.
- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875-877, 2007.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.
- ALAVI, N.; GOLMAKANI, M. -T. Antioxidant properties of whole-cell Spirulina (*Arthrospira platensis*) powder expressed in olive oil under accelerated storage conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 2971-2978, 2017.
- ALGAEBASE. Disponível em:
<http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=24749> Acesso em: 01 jun 2018.
- ALI, H. E. A.; SHANAB, S. M. M.; SHALABY, E. A. A.; EL DEMERDASH, U. M. N.; ABDULLAH, M. A. Evaluation of antioxidants, pigments and secondary metabolites contents in *Spirulina platensis*. In: **Applied Mechanics and Materials**. Trans Tech Publications, 2014. p. 160-163.
- ÁLVAREZ-GÓMEZ, F.; KORBEE, N.; FIGUEROA, F. L. Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. **Ciencias Marinas**, v. 42, n. 4, p. 271-288, 2016.
- AMARO, H. M.; MACEDO, Â. C.; MALCATA, F. X. Microalgae: an alternative as sustainable source of biofuels? **Energy**, v. 44, n. 1, p. 158-166, Aug 2012.
- AMEN, Y. M. et al. New cytotoxic lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lingzhi*. **Phytochemistry Letters**, v. 17, n. 64-70, 2016.
- ANBUCHAZHIAN, R.; KARUPPIAH, V.; LI, Z. Prospect of marine algae for production of industrially important chemicals. In: **Algal Biorefinery: An integrated approach**. Springer, Cham, 2015. p. 195-217.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
Artmed, 2017. 861 p., 2016.

ATANASOVA-PENICHON, V.; BARREAU, C.; RICHARD-FORGET, F. Antioxidant secondary metabolites in cereals: Potential involvement in resistance to *Fusarium* and mycotoxin accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 566, 2016. doi: 10.3389/fmicb.2016.00566

BABIĆ, O.; KOVAČ, D.; RAŠETA, M.; ŠIBUL, F.; SVIRČEV, Z.; SIMEUNOVIĆ, J. Evaluation of antioxidant activity and phenolic profile of filamentous terrestrial cyanobacterial strains isolated from forest ecosystem. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 4, p. 2333-2342, 2016.

BATISTA, A. P.; NICCOLAI, A.; FRADINHO, P.; FRAGOSO, S.; BURSIC, I.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R.; SOUSA, I.; RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and *in vitro* digestibility. **Algal Research**, v. 26, p. 161-171, 2017.

BEERENWINKEL, N.; ANTAL, T.; DINGLI, D.; TRAULSEN, A.; KINZLER, K. W.; VELCULESCU, V. E.; VOGELSTEIN, B.; NOWAK, M. A. Genetic progression and the waiting time to cancer. **PLoS Computational Biology**, v. 3, n. 11, p. e225, 2007.

BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 28-48, 2002.

BISHOP, W. M.; ZUBECK, H. M. Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 2, n. 5, p. 1-6, June 2012.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. **Nature**, London, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, Apr 1958.

BOCANEGRA, A.; BASTIDA, S.; BENEDÍ, J.; RODENAS, S.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 236-258, Apr 2009.

BOLANHO, B. C.; EGEEA, M. B.; JÁCOME, A. L. M.; CAMPOS, I.; DE CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 53, n. 2, p. 171-179, 2014.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMOES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, p. 256-265, 2013.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.

CABRERA-CARRIÓN, J. L.; JARAMILLO-JARAMILLO, C.; DÚTAN-TORRES, F.; CUN-CURRIÓN, J.; GARCÍA, P. A.; ASTUDILLO, L. R. Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. **Bioagro**, Viçosa, v. 29, n. 1, p. 53-60, 2017.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86-96, 2017.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 51, p. 15-25, Jan 2013.

CASTRO, A. H. F.; BRAGA, K. Q.; SOUSA, F. M.; COIMBRA, M. C.; CHAGAS, R. C. R. Callus induction and bioactive phenolic compounds production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 143-151, jan-mar 2016.

CERVANTES-GARCIA, D.; TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; GONZÁLEZMENDOZA, D.; GUTIERREZ-MICELI, F.; CECEÑA-DURAN1, C.; DE DE CHA, K. H.; KANG, S. W.; KIM, C. Y.; UM, B. H.; NA, Y. R.; PAN, C. H. Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4756-4761, 2010.

CEPOI, L.; RUDI, L.; MISCU, V.; COJOCARI, A.; CHIRIAC, T.; SADOVNIC, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. **Fascicula Biologie**, v. 16, n. 2, p. 43-48, 2009.

CHEN, H. W.; YANG, T. S.; CHEN, M. J.; CHANG, Y. C., CHEN WANG, E. I.; HO, C. L.; LAI, Y. J.; YU, C. C.; CHOU, J. C.; CHAO, L. K. P.; LIAO, P. C. Purification and immunomodulating activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1337-1344, Aug 2014.

CHEN, Y. Y.; CHEN, J. C.; TAYAG, C. M.; LI, H. F.; PUTRA, D. F.; KUO, Y. H.; BAI, J. C.; CHANG, Y. H. *Spirulina* elicits the activation of innate immunity and increases resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 55, p. 690-698, 2016.

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; CHEN, T. Y.; CHANG, Y. B.; KUO, C. M.; LIN, C. S. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 184, p. 179-189, May 2015.

CHOUDHARY, M.; JETLEY, U. K.; ABASH KHAN, M.; ZUTSHI ,S.; FATMA, T. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, n. 2, p. 204-209, 2007.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 996-1006, Dec 1985.

CIMINO, S.; SORTINO, G.; FAVILLA, V.; CASTELLI, T.; MADONIA, M.; SANSALONE, S.; RUSSO, G. I.; MORGIA, G. Polyphenols: key issues involved in chemoprevention of prostate cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, Article ID 632959, 8 pages. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2012/6329592012>> Acesso em: 16 jul. 2018.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2010.

CORNISH, M. L.; GARBARY, D. J. Antioxidants from macroalgae: Potential applications in human health and nutrition. **Algae**, v. 4, n. 25, p. 155-171, Nov 2010.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CRUZ, P. N. **Potencial antioxidante e antimicrobiano dos extratos obtidos da semente de butiá da praia (*Butia catarinensis*)**. 2016. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CZERWONKA, A.; KAŁAWAJ, K., SŁAWIŃSKA-BRYCH, A., LEMIESZEK, M. K., BARTNIK, M., WOJTANOWSKI, K. K.; ZDZISIŃSKA, B.; RZESKI, W. Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 292-302, 2018.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

DE MULE, M. C. Bioactive substances from *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **International Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 93-96, 1996.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 168-174, 2018.

DEJSUNGKRANONT, M.; CHEN, H. H.; SIRISANSANEYAKUL, S. Enhancement of antioxidant activity of C-phycoyanin of *Spirulina* powder treated with supercritical fluid carbon dioxide. **Agriculture and Natural Resources**, v. 51, n. 5, p. 347-354, 2017.

DEY, S.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 271-276, Jan 2013.

DHONGADE, H. J.; CHANDEWAR, A. V. An *in-vitro* investigation of the antioxidant activity of *Phyllanthus amarus*. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 4, n. 6, p. 435-439, June 2013.

DISSANAYAKE, S.; DENNY, W. A.; GAMAGE, S.; SAROJINI, V. Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides. **Journal of Controlled Release**, v. 250, p. 62-76, 2017.

DO NASCIMENTO-NETO, L. G.; CABRAL, M. G.; CARNEIRO, R. F.; SILVA, Z., ARRUDA, F. V. S.; NAGANO, C. S.; FERNANDES, A. R.; SAMPAIO, A. H.; VIDEIRAE, P. A. Halilectin-3, a lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*, induces apoptosis and autophagy in human breast cancer MCF7 cells through caspase-9 pathway and LC3-II protein expression. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1-8, 2018.

DUAN, X. J.; ZHANG, W. W.; LI, X. M.; WANG, B. G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 37-43, Mar 2006.

ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 990-1004, Sept 2012.

EL-BAKY, H. H. A.; EL BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects *in vitro* toward hepatotoxicity model. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 133-139, 2009.

EROĞLU, C.; AVCI, E.; VURAL, H.; KURAR, E. Anticancer mechanism of sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. **Gene**, v. 671, p. 127-134, 2018.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p. 22-24, 2016. 200 p.

FENNELL, C. W.; LINDSEY, K. L.; MCGAW, L. J.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E.; GRACE, O. M.; VAN STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 205-217, 2004.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 375-392, 2014.

FU, L.; LU, W.; ZHOU, X. Phenolic compounds and *in vitro* antibacterial and antioxidant activities of three tropic fruits: persimmon, guava, and sweetsop. **BioMed Research International**, v. 2016, Article ID 4287461, 9 pages, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4287461>> Acesso em: 16 jul. 2018.

GARGOURI, M.; MAGNÉ, C.; EL FEKI, A. Hyperglycemia, oxidative stress, liver damage and dysfunction in alloxan-induced diabetic rat are prevented by *Spirulina* supplementation. **Nutrition Research**, v. 36, n. 11, p. 1255-1268, 2016.

GOIRIS, K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; DE BRABANTER, J.; DE COOMAN, L. *et al.* Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1477-1486, 2012.

GOLMAKANI, M. T.; MOOSAVI-NASAB, M.; KERAMAT, M.; MOHAMMADI, M. A. *Spirulina (Arthrospira platensis)* extract as a natural antioxidant for improving oxidative stability of common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) oil. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 18, n. 11, p. 1315-1323, 2018.

GOUPY, P. DUFOUR, C.; LOONIS, M.; DANGLES, O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 615-622, 2003.

GRIMA, E. M.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES-MEDINA, A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, Jan 2003.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 22, n. 6, p. 315-326, 2011.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709-732, May-June 2012.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 35, p. 1147-1150, Nov 2007.

HAMED, S. M.; SELIM, S.; KLOCK, G.; ABD-ELGAWAD, H. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 19-25, 2017.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G. M.; DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 3, p. 1037-1047, Apr 2010.

HASSOUANI, M.; SABOUR, B.; BELATTMANIA, Z.; EL ATOUANI, S.; REANI, A.; RIBEIRO, T; URBATZKA, R.; LEÃO, P.; VASCONCELOS, V. *In vitro* anticancer, antioxidant and antimicrobial potential of *Lyngbya aestuarii* (Cyanobacteria) from the Atlantic coast of Morocco. **Journal of Materials and Environmental Sciences**, v. 8, n. S, p. 4923-4933, 2017

HERNANDEZ, F. Y. F.; KHANDUAL, S.; LÓPEZ, I. G. R. Cytotoxic effect of *Spirulina platensis* extracts on human acute leukemia Kasumi-1 and chronic myelogenous leukemia K-562 cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 1, p. 14-19, 2017.

HERRERO, M. *et al.* Screening for bioactive compounds from algae. **Advanced Biofuels and Bioproducts**. Springer New York, 2013. p. 833-872.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by *Arthrospira*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Arthrospira plantensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423-434, 2002.

HOSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231-1237, 2013.

HUANG, Y.; LIU, J.; WANG, H.; GAO, Z. Treatment potential of a synergistic botanical pesticide combination for rotifer extermination during outdoor mass cultivation of *Spirulina platensis*. **Algal Research**, v. 6, p. 139-144, 2014.

JABEEN, A.; REEDER, B.; HISAINDEE, S.; ASHRAF, S.; AL DARMAKI, N.; BATTAH, S.; AL-ZUHAIR, S. Effect of enzymatic pre-treatment of microalgae extracts on their anti-tumor activity. **Biomedical Journal**, v. 40, n. 6, p. 339-346, Dec 2017.

JIANG, L.; WANG, Y.; LIU, G.; LIU, H.; ZHU, F.; JI, H.; LI, B. C-Phycocyanin exerts anti-cancer effects via the MAPK signaling pathway in MDA-MB-231 cells. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 12, 2018.

JIANG, L.; WANG, Y.; YIN, Q.; LIU, G.; LIU, H.; HUANG, Y.; LI, B. Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 17, p. 3416, 2017.

KASOTE, D. M.; KATYARE, S. S.; HEGDE, M. V.; BAE, H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 982-991, 2015.

KATO, K.; NINOMIYA, M.; TANAKA, K.; KOKETSU, M. Effects of functional groups and sugar composition of quercetin derivatives on their radical scavenging properties. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 7, p. 1808-1814, July 2016.

KHAFAGA, A. F.; EL-SAYED, Y. S. *Spirulina* ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. **Life sciences**, v. 196, p. 9-17, 2018.

KHATUA, S.; ROY, T.; ACHARYA, K. Antioxidant and free radical scavenging capacity of phenolic extract from *Russula laurocerasi*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 4, p. 156-160, Oct-Dec 2013.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds – A review. **Molecules**, Basel, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KORU, E. **Earth Food Spirulina (Arthrospira)**: Production and quality standarts (PDF Free Download). 2012. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/221925238_Earth_Food_Spirulina_Arthrospira_Production_and_Quality_Standarts?_sg=1uLD3TIKD3WTGvHX6N0At9H4eqCRKmZYfAzy3XRnAiwXQ61BCT8BkZmBzLKN-8QXyeWNXITWSA> Acesso em: 01 jun. 2018.

KUNTZLER, S. G.; DE ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; DE MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 1008-1014, 2018.

LAGANÀ, P.; AVVENTUROSO, E.; ROMANO, G.; GIOFFRÉ, M. E.; PATANÈ, P.; PARISI, S.; MOSCATO, U.; DELIA, S. Classification and technological purposes of food additives: The European point of view. *In: Chemistry and Hygiene of Food Additives*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer, Cham, 2017. p. 1-21.

LEE, I.; HAN, J. I. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 186, p. 246-251, 2015.

LEWISOSCAR, F.; NITHYA, C.; ALHARBI, S. A.; ALHARBI, N. S.; THAJUDDIN, N. *In vitro* and *in silico* attenuation of quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa* using *Spirulina platensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 246-256, 2018.

LEWISOSCAR, F.; NITHYA, C.; BAKKIYARAJ, D.; ARUNKUMAR, M.; ALHARBI, N. S.; THAJUDDIN, N. Biofilm inhibitory effect of *Spirulina platensis* extracts on bacteria of clinical significance. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 87, n. 2, p. 537-544, 2017.

LI, B.; GAO, M. H.; CHU, X. M.; TENG, L.; LV, C. Y.; YANG, P.; YIN, Q. F. The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycoerythrin on the lung cancer A549 cells *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, v. 749, p. 107-114, 2015.

LI, B.; ZHANG, X.; GAO, M.; CHU, X. Effects of CD59 on antitumoral activities of phycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, n. 10, p. 551-560, 2005.

LIAO, Q.; LI, L.; CHEN, R.; ZHU, X. A novel photobioreactor generating the light/dark cycle to improve microalgae cultivation. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 186-191, 2014.

LIMA, V. N., OLIVEIRA-TINTINO, C. D., SANTOS, E. S., MORAIS, L. P., TINTINO, S. R., FREITAS, T. S.; GERALDO, Y. S.; PEREIRA, R. L. S.; CRUZ, R. P.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 56-61, 2016.

LIU, Q.; HUANG, Y.; ZHANG, R.; CAI, T.; CAI, Y. Medical application of *Spirulina platensis* derived C-phycoerythrin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016. doi: 10.1155/2016/7803846

LORDAN, S.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Marine Drugs**, Basel, v. 9, n. 6, p. 1056-1100, June 2011.

LUQUE-GARCIA, J. L.; DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

- MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y. WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: PUFA profiles, carotenoids and phenolic content. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p. 13-19, Dec 2015.
- MACHADO, M. D.; SOARES, E. V. Short-and long-term exposure to heavy metals induced oxidative stress response in *Pseudokirchneriella subcapitata*. **CLEAN – Soil Air Water**, v. 44, n. 11, p. 1578-1583, Aug 2016.
- MACHU, L.; MISURCOVA, L.; AMBROZOVA, J. V.; ORSAVOVA, J.; MLCEK, J.; SOCHOR, J.; JURIKOVA, T. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1118-1133, 2015.
- MAEDA, Y.; YOSHINO, T.; MATSUNAGA, T.; MATSUMOTO, M.; TANAKA, T. Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 111-120, Apr 2018.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (bluegreen algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.
- MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G. Mass cultivation of freshwater microalgae. *In: Encyclopedia of Ecology*. p. 2226-2235. DOI 10.1016/B978-0-12-409548-9.09373-8, 2014.
- MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1357-1367, 2007.
- MICHAEL, A.; KYEWALYANGA, M. S.; MTOLERA, M. S.; LUGOMELA, C. V. Antioxidants activity of the cyanobacterium, *Arthrospira (Spirulina) fusiformis* cultivated in a low-cost medium. **African Journal of Food Science**, v. 12, n. 8, p. 188-195, 2018.
- MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.
- MOBIN, S.; ALAM, F. Some promising microalgal species for commercial applications: A review. **Energy Procedia**, v. 110, p. 510-517, 2017.
- MOHAN, S. V.; ROHIT, M. V.; CHIRANJEEVI, P.; CHANDRA, R.; NAVANEETH, B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 184, p. 169-178, May 2015.
- MOROWVAT, M. H.; GHASEMI, Y. Evaluation of antioxidant properties of some naturally isolated microalgae: Identification and characterization of the most efficient strain. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 263-269, Oct 2016.

MOSAFFA-JAHROMI, M.; LANKARANI, K. B.; PASALAR, M.; AFSHARYPUOR, S.; TAMADDON, A. M. Efficacy and safety of enteric coated capsules of anise oil to treat irritable bowel syndrome. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 937-946, 2016.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, e1000213, 2008.

MURRAY, P. M. *et al.* Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 839-850, Sept 2013.

NGO, T. V.; SCARLETT, C. J.; BOWYER, M. C.; NGO, P. D.; VUONG, Q. V. Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of *Salacia chinensis* L. **Journal of Food Quality**, v. 2017, Article ID 9305047, 8 pages, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2017/93050472017>> Acesso em: 16 jul. 2018.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; ZOLLO, A.; MATHUER, S. B. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 329-334, 2004.

NYSTRÖM, L.; MALMSTEN, M. Membrane interactions and cell selectivity of amphiphilic anticancer peptides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 38, p. 1-17, Nov 2018.

OH, J. -Y.; FERNANDO, I. P. S.; JEON, Y. -J. Potential applications of radioprotective phytochemicals from marine algae. **Algae**, v. 31, n. 4, p. 403-414, 2016.

OLIVARES, H. G.; LAGOS, N. M.; GUTIERREZ, C. J.; KITTELSEN, R. C.; VALENZUELA, G. L.; LILLO, M. E. H. Assessment oxidative stress biomarkers and metal bioaccumulation in macroalgae from coastal areas with mining activities in Chile. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 1, p. 1-25, Jan 2016.

PAGNUSSATT, F. A.; DE LIMA, V. R.; DORA, C. L.; COSTA, J. A. V.; PUTAUX, J. L.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the encapsulation effect of phenolic compounds from *Spirulina* sp. LEB-18 on their antifusarium activities. **Food Chemistry**, v. 211, p. 616-623, 2016.

PAGNUSSATT, F. A.; DEL PONTE, E. M.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 108, p. 21-26, 2014.

PAK, W.; TAKAYAMA, F., MINE, M., NAKAMOTO, K., KODO, Y., MANKURA, M.; EGASHIRA, T.; KAWASAKI, H.; MORI, A. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Spirulina* on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2012

PALIWAL, C.; GHOSH, T.; GEORGE, B.; PANCHA, I.; MAURYA, R.; CHOKSHI, K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. **Algal Research**, v. 15, p. 24-31, 2016.

- PANDA, P. K., MUKHOPADHYAY, S., BEHERA, B., BHOL, C. S., DEY, S., DAS, D. N.; SINHA, N.; BISSOYI, A.; PRAMANIK, K.; MAITI, T. K.; BHUTIA, S. K. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sciences**, v. 111, n. 1-2, p. 27-35, 2014.
- PANDEY, R., ZINTA, G.; ABD ELGAWAD, H.; AHMAD, A.; JAIN, V.; JANSSENS, I. A. Physiological and molecular alterations in plants exposed to high [CO₂] under phosphorus stress. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 3-4, p. 303-316, 2015.
- PANE, G.; CACCIOLA, G.; GIACCO, E.; MARIOTTINI, G. L.; COPPO, E. Assessment of the antimicrobial activity of algae extracts on bacteria responsible of external otitis. **Marine Drugs**, Basel, v. 13, p. 6440-6452, 2015.
- PARWANI, L.; BHATNAGAR, M.; BHATNAGAR, A.; SHARMA, V. Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1473-1482, 2014.
- PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776-1782, Oct 2014.
- PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 26, 2016.
- PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; GARCÍA-BLAIRSY, R. G.; HERRERO, M.; SEÑORÁNS, F. J.; IBÁÑEZ, E. Screening for bioactive compounds from algae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 450-455, Jan 2010.
- RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, p. 479-483, 2004.
- RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.
- 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.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied Phycology**. Black Well Science Ltd., 2004.
- RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of microalgal culture: applied Phycology and Biotechnology**. John Wiley & Sons, 2013.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, 2005.

- ROMAY, C. H.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-phycoerythrin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 207-216, 2003.
- SABATINI, S. E.; JUÁREZ, A. B.; EPPIS, M. R.; BIANCHI, L.; LUQUET, C. M.; MOLINA, M. C. R. Oxidative stress and antioxidant defenses in two green microalgae exposed to copper. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n.4, p. 1200-1206, May 2009.
- SÁEZ, C. A.; RONCARATI, F.; MOENNE, A.; MOODY, A. J.; BROWN, M. T. Copper-induced intra-specific oxidative damage and antioxidant responses in strains of the brown alga *Ectocarpus siliculosus* with different pollution histories. **Aquatic Toxicology**, v. 159, p. 81-89, Feb 2015.
- SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Ed.). **Natural products isolation**. Springer Science & Business Media, p. 372-380, 2006.
- SCAGLIONI, P. T.; BADIALE-FURLONG, E. Can microalgae act as source of preservatives in food chain? **Journal of Food Science and Engineering**, v. 7, p. 283-296, 2017.
- SCAGLIONI, P. T.; DE OLIVEIRA-GARCIA, S.; BADIALE-FURLONG, E. Inhibition of *in vitro* trichothecenes production by microalgae phenolic extracts. **Food Research International**, 2018 *in press*. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.008>> Acesso em: 16 jul. 2018.
- SCHNEIDER, C. A; RASBAND, W. S; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p.271-275, July 2012.
- SCOTT, A. M.; ALLISON, J. P.; WOLCHOK, J. D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. **Cancer Immunity Archive**, v. 12, 8 p. May 2012.
- SENGUPTA, S.; KOLEY, H.; DUTTA, S.; BHOWAL, J. Hypocholesterolemic effect of *Spirulina platensis* (SP) fortified functional soy yogurts on diet-induced hypercholesterolemia. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 54-64, 2018.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.
- SHANAB, S. M.; MOSTAFA, S. S.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 608-615, 2012.
- SHEBIS, Y.; ILUZ, D.; KINEL-TAHAN, Y.; DUBINSKY, Z.; YEHOSHUA, Y. Natural antioxidants: function and sources. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 6, p. 643-649, June 2013.
- SHETE, V.; QUADRO, L. Mammalian metabolism of β -carotene: gaps in knowledge. **Nutrients**, v. 5, n. 12, p. 4849-4868, 2013.

SHIN, Y. S.; CHOI, H. I.; CHOI, J. W.; LEE, J. S.; SUNG, Y. J.; SIM, S. J. Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. **Bioresource technology**, v. 258, p. 335-344, 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 7-30, 2017.

SILI, C.; TORZILLO, G.; VONSHAK A. *Arthrospira* (Spirulina). In: Whitton, B. A. (eds). **Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time**. Springer; 2012. p. 677-705. Disponível em:
<https://books.google.com.br/books?id=4oJ_vi27s18C&pg=PA677&lpg=PA677&dq=SILI;+TORZILLO;+VONSHAK,+2012&source=bl&ots=JF0n2PuHUU&sig=33PGbhpH-wwZV8PAXWQCKRvjEUU&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjJwJv81rLbAhWBS5AKHaObCKYQ6AEIXzAN#v=onepage&q=SILI%3B%20TORZILLO%3B%20VONSHAK%2C%202012&f=false> Acesso em: 01 jun. 2018.

SILVA, A. S.; MOREIRA, L. M.; MAGALHÃES, W. T.; FARIAS, W. R. L.; ROCHA, M. V. P.; BASTOS, A. K. P. Extraction of biomolecules from *Spirulina platensis* using non-conventional processes and harmless solvents. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 3, p. 2101-2106, 2017.

SILVA, J. W. A. **Cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em efluentes aquícolas e sua influência na concentração lipídica**. 2013. 48 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul-set 2010.

SIRIWARDHANA, N.; LEE, K. -W.; JEON, Y. -J; KIM, S. -H.; HAW, J. -W. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on reactive oxygen species scavenging and lipid peroxidation inhibition. **Food Science and Technology International**, v. 9, n. 5, p. 339-346, 2003.

ŚLUSARZ, A.; SHENOUDA, N. S.; SAKLA, M. S.; DRENKHAHN, S. K.; NARULA, A. S.; MACDONALD, R. S.; WILLIFORD, B.; LUBAHN, D. B. Common botanical compounds inhibit the hedgehog signaling pathway in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3382-3390, 2010.

SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. *Spirulina* – From growth to nutritional product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 157-171, 2017.

SOUSA, C. S. **Atividades antioxidante, antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de extratos da macroalga marinha parda *Lobophora variegata* (J. V. Lamouroux)**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SOUZA, M. M. D.; PRIETTO, L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1050-1058, 2011.

SZLISZKA, E.; CZUBA, Z. P.; BRONIKOWSKA, J.; MERTAS, A.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Ethanolic extract of propolis augments TRAIL-induced apoptotic death in prostate cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

TALERO, E.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; ÁVILA-ROMÁN, J.; RODRÍGUEZ-LUNA, A.; ALCAIDE, A.; MOTILVA, V. Bioactive compounds isolated from microalgae in chronic inflammation and cancer. **Marine Drugs**, v. 13, n. 10, p. 6152-6209, 2015.

TANG, D.; LI, H. J.; CHEN, J.; GUO, C. W.; LI, P. Rapid and simple method for screening of natural antioxidants from Chinese herb Flos Lonicerae Japonicae by DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 20, p. 3519-3526, Oct 2008.

TAYAG, C. M.; LIN, Y. C.; LI, C. C.; LIOU, C. H.; CHEN, J. C. Administration of the hot-water extract of *Arthrospira platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, p. 764-773, 2010.

TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K.; YEGANEH, S. The effects of *Arthrospira platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 396-399, n. 1, p. 14-19, 2013.

TIAN, Y.; LI, Y. -L.; ZHAO, F. -C. Secondary metabolites from polar organisms. **Marine Drugs**, Basel, v. 15, n. 3, p. 1-30, 2017.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87-108, 2015.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre:

TOUTAIN-KIDD, C. M.; KADIVAR, S. C.; BRAMANTE, C. T.; BOBIN, S. A.; ZEGANS, M. E. Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 136-145, 2009.

TRIPATHI, B. N.; GAUR, J. P. Relationship between copper-and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. **Planta**, v. 219, n. 3, p. 397-404, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 2006.

VAN GESTEL, T.; VAN DER BRUGGEN, B.; BUEKENHOUDT, A.; DOTREMONT, C.; LUYTEN, J.; VANDECASTEELE, C.; MAES, G. Surface modification of γ -Al₂O₃/TiO₂ multilayer membranes for applications in non-polar organic solvents. **Journal of Membrane Science**, v. 224, n. 1-2, p. 3-10, 2003.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303-313, 2001.

VINATORU, M.; TOMA, M.; RADU, O.; FILIP, P. I.; LAZURCA, D.; MASON, T. J. The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 4, n. 2, p. 135-139, 1997.

WAN, D.; WU, Q.; KUČA, K. *Spirulina*. **Nutraceuticals**, p. 569-583, 2016.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; LI, X. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 804-810, 2008.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chemistry**, Oxford, v. 116, n. 1, p. 240-248, 2009.

WATANUKI, H.; OTA, K.; TASSAKKA, A. C. M. A. R.; KATO, T.; SAKAI, M. Immunostimulant effects of dietary *Arthrospira platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 258, n. 1, p. 157-163, Aug 2006.

YADAV, S. S.; STOCKERT, J. A.; HACKERT, V.; YADAV, K. K.; TEWARI, A. K. Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *In*: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2018.

YANG, H.; XUE, X.; LI, H.; TAY-CHAN, S. C.; ONG, S. P.; TIAN, E. F. A new parameter to simultaneously assess antioxidant activity for multiple phenolic compounds present in food products. **Food Chemistry**, v. 229, p. 215-222, Aug 2017.

YEGANEH, S.; TEIMOURI, M.; AMIRKOLAIE, A. K. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 84-88, 2015.

ZAID, A. A. A.; HAMMAD, D. M.; SHARAF, E. M. Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 7, p. 846-851, 2015.

ZENG, X.; GUO, X.; SU, G.; DANQUAH, M. K.; ZHANG, S.; LU, Y.; SUN, Y.; LIN, L. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1385-1392, Feb 2015.

ZHANG, X., PENG, X., YU, W., HOU, S., ZHAO, Y., ZHANG, Z.; HUANG, X.; WU, K. Alpha-tocopheryl succinate enhances doxorubicin-induced apoptosis in human gastric cancer cells via promotion of doxorubicin influx and suppression of doxorubicin efflux. **Cancer Letters**, v. 307, n. 2, p. 174-181, 2011.

ZHAO, J. M.; MA, C. Y.; LIU, L. H. Temporal scaling of the growth dependent optical properties of microalgae. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 214, p. 61-70, July 2018.