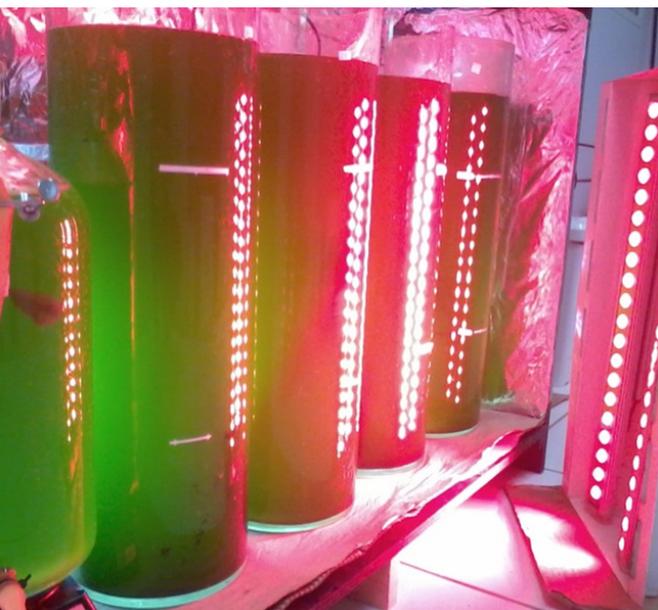


Avaliação da Composição Celular e da Toxicidade Aguda e Subcrônica de Material Algáceo Produzido com Efluentes da Suinocultura



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11

Avaliação da Composição Celular e da Toxicidade Aguda e Subcrônica de Material Algáceo Produzido com Efluentes da Suinocultura

Alexandre Matthiensen
Mayara Breda
Julia Nonnenmacher
William Michelin
Silvane Roman
Elisabete Maria Zanin
Helissara Silveira Diefenthaler
Rogério Luiz Cansian
Albanin Aparecida Mielniczki Pereira
Márcio Busi da Silva

Embrapa Suínos e Aves
Concórdia, SC
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Rodovia BR 153 - KM 110
89.715-899, Concórdia-SC
Caixa Postal 321
Fone: (49) 3441 0400
Fax: (49) 3441 0497
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê de Publicações da Embrapa Suínos e Aves

Presidente: Marcelo Miele
Secretária: Tânia M.B. Celant
Membros: Airton Kunz
Ana Paula A. Bastos
Gilberto S. Schmidt
Gustavo J.M.M. de Lima
Monalisa L. Pereira
Suplentes: Alexandre Matthiensen
Sabrina C. Duarte

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant
Revisão técnica: Fabiane G. Antes e Ricardo L.R. Steinmetz
Revisão gramatical: Lucas S. Cardoso
Normalização bibliográfica: Cláudia A. Arrieche
Editoração eletrônica: Vivian Fracasso
Fotos da capa: Airton Kunz, Márcio L. Busi e Willian Michelon

1ª edição

Versão eletrônica (2016)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Suínos e Aves**

Avaliação da composição celular e da toxicidade aguda e subcrônica de material algáceo produzido com efluentes da suinocultura / por Alexandre Matthiensen... [et al.]. - Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2016.
73 p.; 21 cm. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Suínos e Aves, ISSN 1678-8842; 11)

1. Suíno. 2. Dejeito. 3. Algas. 4. Toxidez. 5. Agricultura sustentável. 6. Preservação ambiental. I. Título. II. Série. III. Breda, Mayara. IV. Nonnenmacher, Julia. V. Michelon, William. VI. Roman, Silvane. VII. Zanin, Elisabete Maria. VIII. Diefenthaler, Helissara Silveira. IX. Cansian, Rogério Luiz. X. Pereira, Albanin A. M. XI. Silva, Márcio Busi da.

CDD 631.7

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	17
Produção de biomassa microalgal.....	17
Composição química celular.....	18
Determinação de Na e K.....	19
Determinação de P.....	19
Determinação de Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn.....	19
Determinação de lipídios.....	20
Determinação do perfil de ácidos graxos.....	20
Determinação de proteínas.....	20
Determinação de carboidratos.....	21
Determinação de cinzas.....	21
Testes toxicológicos.....	21
Lise celular mecânica.....	21
Ensaio da toxicidade aguda.....	22
Ensaio da toxicidade subcrônica.....	23
Análise estatística.....	24

Resultados e Discussão	24
Identificação e composição celular das microalgas.....	24
Lise celular mecânica.....	27
Ensaio da toxicidade.....	29
Ensaio da toxicidade aguda.....	31
Administração via intraperitoneal.....	31
Mortalidade.....	31
Sinais clínicos de toxicidade.....	31
Peso corporal.....	34
Consumo de ração e água.....	35
Peso absoluto e relativo dos órgãos.....	37
Administração via gavagem.....	39
Sinais clínicos de toxicidade.....	39
Peso corporal.....	41
Consumo de ração e água.....	42
Peso absoluto e relativo dos órgãos.....	43
Ensaio da toxicidade subcrônica.....	45
Mortalidade.....	45
Sinais clínicos de toxicidade.....	45
Peso corporal.....	47
Consumo de ração e água.....	49
Peso absoluto e relativo dos órgãos.....	52
Conclusão	54
Agradecimentos	55
Referências	56

Avaliação da Composição Celular e da Toxicidade Aguda e Subcrônica de Material Algáceo Produzido com Efluentes da Suinocultura

Alexandre Matthiensen¹

Mayara Breda²

Julia Nonnenmacher³

William Michelin⁴

Silvane Roman⁵

Elisabete Maria Zanin⁶

Helissara Silveira Diefenthaeler⁷

Rogério Luiz Cansian⁸

Albanin Aparecida Mielniczki Pereira⁹

Márcio Busi da Silva¹⁰

Resumo

Microalgas são organismos facilmente encontrados em ambientes aquáticos. São conhecidas por desempenharem papel importante na autodepuração de águas residuais, biorremocção de metais e atuarem em processos de tratamento de efluentes, gerando produtos como fertilizantes. Este trabalho concentrou esforços na avaliação da composição celular e da toxicologia de um consórcio de microalgas produzido em digestato de efluente da suinocultura. O interesse particular reside na produção de metabólitos secundários, que podem ser entendidos como uma resposta química às variações ambientais na tentativa das microalgas em se adaptar a um novo ambiente. O estudo focou na eventual acumulação de metabólitos em função de estresse ambiental induzido. Procurou-se avaliar a composição celular do material algáceo produzido

¹ Oceanologia, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

nos fotobiorreatores, e foram realizados experimentos toxicológicos com metodologias padrão em modelo animal (bioensaio com camundongos) para avaliação das toxicidades aguda e subcrônica do material algáceo. Foi observado aumento da concentração de lipídeos nas células após estresse nutricional. Os ensaios toxicológicos apresentaram toxicidade nas doses usadas, com toxicidade maior via intraperitoneal e menor via gavagem. Foram definidas doses consideradas seguras para ensaios subcrônicos via oral. Esses resultados devem dar suporte a experimentos posteriores utilizando o material algáceo como suplemento alimentar de aves, como um dos principais destinos da biomassa algal produzida com resíduos da suinocultura.

Palavras-chaves: microalgas, bioensaios toxicológicos, toxicidade aguda, toxicidade subcrônica.

² Acadêmica do curso de Ciências Biológicas, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS

³ Acadêmica do curso de Farmácia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS

⁴ Professor do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade do Contestado, Concórdia, SC

⁵ Professora titular do Departamento de Ciências da Saúde, Laboratório de Histologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS

⁶ Professora titular do Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Geoprocessamento e Planejamento Ambiental, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS

⁷ Professora titular do Departamento de Ciências da Saúde, Laboratório de Farmacologia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS

⁸ Professor titular do Departamento de Ciências Agrárias, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS

⁹ Professora titular do Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim, RS

¹⁰ Biólogo, doutor, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Evaluation of Cell Composition and Acute and Subchronic Toxicity of Algal Material Produced With Swine Manure Effluents

Abstract

Microalgae are organisms easily found in aquatic environments. They are known to play an important role in the depuration of waste water, metal bioremoval and acting on effluent treatment processes, generating products such as fertilizers. This work concentrated its efforts on the evaluation of cellular composition and toxicology of a microalgae consortium produced in digestate effluent from pig farming. The particular interest lies in the production of secondary metabolites, which can be understood as a chemical response to environmental variations in trial of microalgae to adapt to a new environment. The study focused on the possible accumulation of metabolites in response to induced environmental stress. We sought to evaluate the cellular composition of the algal material produced in photobioreactors, and toxicological experiments were conducted with standard methodologies in animal models (mice bioassay) for the evaluation of acute and sub-chronic toxicity of the algal biomass. There was an increase in the concentration of lipids in algal cells after nutritional stress. Toxicological tests showed toxicity at the doses used, with higher toxicity via intraperitoneal and lower via gavage. The dose considered safe for sub-chronic oral tests was defined. These results should support further experiments using algal material produced as a food supplement for poultry, as one of the main

destinations of algal biomass produced with pig farming residues.

Index terms: microalgae, toxicological bioassays, acute toxicity, sub-chronic toxicity.

Introdução

Microalgas são organismos unicelulares microscópicos, facilmente encontradas em diversos ambientes aquáticos, como de água doce, salobra, salgada, águas residuais ou lugares com elevada umidade (BORGES *et al.*, 2007). Neste grupo, estão incluídos organismos procariontes (Reino Monera, ex: cianobactérias) e organismos eucariontes (Reino Protista) (GALINDRO, 2012). Além de sua capacidade de realizar fotossíntese, atualmente vêm recebendo atenção devido à sua habilidade em acumular compostos altamente energéticos, como proteínas, lipídios e carboidratos, além da sintetização de pigmentos e de seu relevante potencial no sequestro de carbono (PACHECO *et al.*, 2015). É reconhecido que as microalgas desempenham um papel importante na autopurificação de águas residuais, na biorremoção de metais pesados, e atuam em processos de tratamento de efluentes, gerando produtos como fertilizantes (MATOS *et al.*, 2015). Além disso, atualmente, existe uma grande demanda por microalgas nas indústrias nutracêutica e farmacêutica devido a seus efeitos positivos na saúde (FERREIRA *et al.*, 2013). Em meados de 1950, o aumento populacional e as previsões da insuficiência de suplementos proteicos levou à busca de novas alternativas e fontes não convencionais de proteínas (BECKER, 2013; YAMAGUCHI, 1996). A biomassa algal apareceu ao mesmo tempo como uma boa candidata para essa proposta, pois é capaz de melhorar o conteúdo nutricional de alimentos convencionais devido à sua composição química original (SPOLAORE *et al.*, 2006). Na Tabela 1, é apresentada uma comparação entre as composições gerais das principais fontes de alimentos usadas para alimentação humana com diferentes espécies de microalgas.

A qualidade nutricional da proteína é determinada pelo seu perfil de aminoácidos. Na maioria das microalgas, o perfil de aminoácidos é comparável ao perfil padrão para a nutrição humana, proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), pois as células de microalgas têm capacidade de sintetizar os aminoácidos essenciais e não-essenciais (SAFI

et al., 2013; 2014). As microalgas em geral possuem mais de 54 oligoelementos, necessários para as funções fisiológicas do corpo humano, em quantidades superiores às encontradas em legumes e outras plantas terrestres (DHARGALKAR; VERLECAR, 2009). De acordo com Becker (2013), os carboidratos presentes nas microalgas apresentam uma eficiente digestibilidade, razão pela qual não existe limitação no uso da sua biomassa seca para complementação de alimentos ou ração, e podem ser encontrados na forma de amido, glucose e outros polissacarídeos. Os lipídios são compostos basicamente por glicerol e bases esterificadas de ácidos graxos saturados ou insaturados, sendo que alguns pertencem as famílias $\omega 3$ e $\omega 6$, e sua média varia entre 1% a 70% de peso seco, sendo que pode chegar até 90% em certas condições (METTING JÚNIOR, 1996). Além disso, esses ácidos graxos podem ser extraídos para sua conversão em biodiesel (BECKER, 2008).

Atualmente, o extrato de microalgas pode ser encontrado nas mais diferentes formas, como cápsulas, comprimidos e bebidas, além de se encontrarem incorporadas em massas, lanches, doces e chicletes (LIANG *et al.*, 2004). Devido às suas propriedades químicas, elas podem atuar como um suplemento nutricional e fonte natural de corantes em alimentos (SOLETTO *et al.*, 2005).

Tabela 1. Composição geral de diferentes fontes de alimentos humanos e algas (% da matéria seca).

Microalga/Produto	Grupo	Fitoplactônico	Carboidratos	Lipídios	Proteínas
<i>Anabaena cylindrica</i>	Cianobactéria	25-30	4-7	43-56	
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cianobactéria	23	3	62	
<i>Arthrospira maxima</i>	Cianobactéria	13-16	6-7	60-71	
<i>Spirulina maxima</i>	Cianobactéria	13-16	6-7	60-71	
<i>Spirulina platensis</i>	Cianobactéria	8-14	4-9	43-63	
<i>Synechococcus</i> sp.	Cianobactéria	15	11	63	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Clorofíceas	17	21	48	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Clorofíceas	12-17	14-22	51-58	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Clorofíceas	20-70	13-15	20-60	
<i>Chlorella minutissima</i>	Clorofíceas	14-42	31-57	9-24	
<i>Chlorella emersonii</i>	Clorofíceas	11-41	29-63	28-32	
<i>Dunaliella salina</i>	Clorofíceas	32	6	57	
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Clorofíceas	5-17	9-62	23-59	
<i>Protothecoides auxenochlorella</i>	Clorofíceas	41-52	11-23	36-38	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Clorofíceas	10-17	12-14	13-16	
<i>Spirogyra</i> sp.	Clorofíceas	33-64	11-21	6-20	
<i>Euglena gracilis</i>	Euglenofíceas	14-18	6	39-61	
<i>Porphyridium cruentum</i>	Rodofíceas	40-57	9-14	28-39	
Carne	-	1	34	43	
Leite	-	38	34	26	
Arroz	-	77	2	8	
Soja	-	30	20	30	

Fonte: adaptado de Illman *et al.* (2000), Becker (2013), Hu e Gao (2006), Becker (2007), Bruton *et al.* (2009), Zhang *et al.* (2014).

Atualmente, o cultivo microalgal é um dos mais modernos processos biotecnológicos em desenvolvimento. O interesse no estudo da biomassa derivada destes microrganismos ocorre devido à sua utilização comercial em diferentes áreas, como para a produção de biocombustíveis, aquicultura, nutrição humana e animal. Ainda, apresenta potencial para tratamento de águas residuais, remoção de dióxido de carbono atmosférico (CHO *et al.*, 2016) e para a obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química, farmacêutica, nutracêutica, dentre outras (DERNER *et al.*, 2006). Diversas espécies são cultivadas para produzir substâncias específicas, como pigmentos fotossintetizantes (CAMPOS *et al.*, 2010; MIMOUNI *et al.*, 2012). Estes pigmentos, extraídos da biomassa microalgal, podem ser usados como corantes naturais na indústria de cosméticos, funcionando também como fotoprotetores, atuando como pró-vitamina A e contra doenças degenerativas (DERNER *et al.*, 2006). Também, tem demonstrado uma ação antioxidante em vários ensaios *in vitro* de eliminação de radicais livres e em ensaios *in vivo* são evidenciadas atividades anti-inflamatórias (MIMOUNI *et al.*, 2012).

Alguns ácidos graxos sintetizados por microalgas têm alto valor econômico na indústria farmacêutica, pois são os principais precursores de hormônios importantes para o metabolismo (PEREIRA *et al.*, 2012). Além disso, o consumo destes pode ajudar a reduzir o risco de hipertensão, trombose, enfarte do miocárdio, doenças coronarianas, arritmias cardíacas e também tem demonstrado efeito positivo na função cerebral, do sistema nervoso e de doenças crônicas como: diabetes, cancro e desordens autoimunes (SILVA *et al.*, 2012). Auxiliam também na redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos no plasma e reduzem o risco de artrite reumatoide (FERREIRA *et al.*, 2013).

Pesquisas realizadas em alguns países da Ásia e África que consomem diariamente a *Spirulina*, uma cianobactéria, mostraram uma baixa incidência de infecção pelo vírus HIV-1. Esses trabalhos sugerem que estas microalgas apresentam a propriedade de estimular a resposta imunitária (MARTINS, 2009). Além disso, estudos recentes confirmaram atividade

antimicrobiana em extratos de uma linhagem de cianobactéria isolada da Lagoa dos Patos, RS, contra cepas de *M. tuberculosis* MDR (multi-drug resistant) (RAMOS *et al.*, 2015). Estes resultados mostram a importância de estudos detalhados de extratos e toxinas derivados de linhagens de microrganismos como fontes promissoras de moléculas bioativas.

Essa ampla variedade de propriedades terapêuticas resulta dos metabólitos secundários presentes nas espécies de plantas e microrganismos. As funções dos metabólitos secundários na dinâmica dos organismos que os produzem ainda não são completamente conhecidas pela ciência, mas em geral pode ser dito que, enquanto os metabólitos primários (proteínas, carboidratos, etc.) são essenciais para a manutenção e reprodução da vida, os metabólitos secundários (terpenos, fenóis, etc.) servem como um tipo de interface química entre o organismo e seu ambiente, agindo como antioxidantes naturais, fungicidas e toxinas, entre outras funções.

A composição química celular das microalgas pode sofrer alterações conforme variações ambientais físico-químicas, como modificações no pH (TARALDSVIK; MYKLESTAD, 2000; KHALIL *et al.*, 2010), na incidência luminosa (CARVALHO *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2010; WAHIDIN *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2015; GEORGE *et al.*, 2014), na temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 1999; RENAUD *et al.*, 2002; CONVERTI *et al.*, 2009; ROLEDA *et al.*, 2013), nas diferentes concentrações de N e P (CHU *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2014; ADAMS; BUGBEE, 2014; ROOPNARAIN *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2014; WUA; MIAO, 2014; CHU *et al.*, 2014), na concentração de sais (AN *et al.*, 2013), íons metálicos (RUANGSOMBOON *et al.*, 2013) e regimes de cultivos autotrófico-heterotrófico (LU *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2010; MSANNE *et al.*, 2012).

Diversas são as microalgas que podem ser encontradas em um consórcio algáceo, dentre elas a *Chlorella* sp., uma das espécies vendidas como suplemento alimentar (PEREIRA *et al.*, 2012) a qual apresenta diver-

tos benefícios na saúde como a eficácia em úlceras gástricas, ferimentos e constipação, juntamente com a ação preventiva contra a aterosclerose, hipercolesterolemia e atividade antitumoral (BECKER, 2008). Além disso, a ingestão de seu extrato pode aumentar a concentração de hemoglobina, diminuir os níveis de açúcar no sangue, além de agir como um hipocolesterolêmico e como um agente hepatoprotetor em casos de intoxicação por etionina e deficiência nutricional (BARROW; SHAHIDI, 2007). Conforme esses autores, o extrato de *Chlorella* pode ser administrado em mamíferos, de modo a aumentar a proliferação de esplenócitos e a produção de citocinas, podendo ser utilizado como um suplemento para o estímulo da resposta imune. De acordo com Milledge (2011), a substância ativa mais importante nesse gênero é β -1,3-glucano, a qual se acredita ser ativador da imunestimulação, sequestrador de radicais livres e capaz de reduzir lipídeos no sangue.

Outro gênero de microalgas comumente encontrada é a *Scenedesmus*, que apresenta alta eficiência na remoção de fósforo e nitrogênio em esgotos urbanos (MARTINEZ *et al.*, 2000). É considerada cosmopolita, podendo produzir, em cultivos de larga escala, um conteúdo de 50-56% de proteína (SOEDER; HEGEWALD, 1988), além de apresentar altas taxas de crescimento, sendo, portanto, muito utilizada em estudos toxicológicos (GÜÇLÜ; ERTAN, 2012). De acordo com Chu *et al.* (2011), este gênero possui carotenoides reconhecidos por seu potencial antioxidante e terapêutico, como neoxantina, luteína, loraixantina e violaxantina, além da presença de β -caroteno.

Spirulina, *Chlorella* e *Scenedesmus* são microalgas que apresentam em sua composição elevado teor de proteínas e lipídios. *Spirulina* e *Chlorella* possuem certificado Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) emitido pelo Food and Drug Administration (FDA), podendo ser utilizadas como alimento sem oferecer risco à saúde humana, quando em cultivo axênico ou unialgal. Porém, sua toxicidade necessita ser testada quando em comunidade com demais organismos. O gênero *Scenedesmus* já vem sendo utilizado como ração animal e suplemento alimentar (RADMANN, 2007).

Apesar dos benefícios apresentados, diversas microalgas são conhecidas pelo seu potencial toxicológico, sendo necessários estudos, já que de acordo com Cazarin *et al.* (2004), sempre que o homem tiver contato com um novo produto lançado, estudos devem ser realizados com o intuito de verificar os riscos da substância. Guimarães Júnior *et al.* (2013) relatam que alguns gêneros de dinoflagelados, diatomáceas e cianobactérias possuem espécies potencialmente tóxicas, que podem influir na economia e saúde pública, podendo haver contaminação ambiental pela produção e liberação de toxinas ou redução da carga de oxigênio da água caso ocorra uma floração (aumento exponencial do número microalgas de uma mesma espécie).

A toxicologia estuda os efeitos adversos causados pela interação entre as substâncias químicas com os organismos, avaliando a probabilidade da ocorrência dos efeitos adversos devido à exposição a uma determinada substância, e em quais condições ela pode causar danos (AZEVEDO, 2010). A toxicidade de uma substância está relacionada ao comportamento farmacocinético dos compostos, como presença de metabólitos ativos, baixa disponibilidade ou a duração da ação, que pode ser muito curta ou muito longa (MASIMIREMBWA *et al.*, 2003).

Segundo Moura *et al.* (2012) os testes de toxicidade são realizados com o intuito de estabelecer resultados da influência das toxinas sobre os seres ligados, direta ou indiretamente, ao local onde esses agentes tóxicos são liberados. Por isso, informações toxicológicas sobre compostos químicos são obtidas basicamente em testes com animais de laboratórios em condições previamente padronizadas (BOELSTERLI, 2003; TURINI, 2012). O teste de toxicidade aguda ocorre após um único contato (dose única) ou múltiplos contatos com o agente tóxico em um intervalo de 24 horas, avaliando a mortalidade, imobilidade dos organismos e a influência em reações bioquímicas do metabolismo. Os efeitos podem aparecer de imediato ou no decorrer de alguns dias, no máximo duas semanas (PIMENTEL *et al.*, 2006; AMARAL; SILVA, 2008). De acordo com Oga (2003), a dose única é comumente utilizada na determinação da potência da substância alvo em casos de inges-

ção. Nos testes de toxicidade subcrônica, ou de curta duração, o experimento dura, geralmente, entre 21 e 90 dias e decorre do efeito tóxico após exposição prolongada ao agente tóxico, o que permite identificar se o efeito é acumulativo ou não, e auxilia na detecção dos órgãos afetados após serem submetidos a doses múltiplas. Os animais devem ser observados ao menos uma vez ao dia quanto ao consumo de ração, peso, mudança de cor, textura do pelo, alteração motora e alteração de comportamento (MOURA *et al.*, 2012).

Devido ao grande interesse em microalgas, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial toxicológico agudo e subcrônico do extrato algal produzido a partir do efluente da suinocultura, pelas vias intraperitoneal e gavagem, em modelo animal padrão de teste toxicológico em camundongos. O estudo focou na resposta dos camundongos à possível produção e acumulação de metabólitos pelas microalgas em função de estresse ambiental (privação de N no meio de cultura). O interesse particular reside nos metabólitos secundários, que podem ser entendidos como respostas químicas das microalgas às variações ambientais, para se adaptarem ao novo ambiente.

O presente Boletim de Pesquisas é resultado de uma atividade intitulada Avaliação da composição quali-quantitativa e a toxicidade do material algáceo produzido, e faz parte do Plano de Ação 7 - Desenvolvimento e operacionalização de dois sistemas biológicos para tratamento do efluente de biodigestores, que é parte do projeto MP2 Tecnologias para a produção e uso de biogás e fertilizantes a partir do tratamento de dejetos animais no âmbito do plano ABC (02.12.08.0004.00.00).

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Setor de Laboratórios de Análises Físico-Químicas, no Laboratório de Experimentação e Análise Ambiental, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves, localizada em Concórdia, SC, e no biotério do Departamento de Ciências da Saúde, Laboratório de Histologia, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, RS.

Produção de biomassa microalgal

O efluente utilizado para o cultivo de microalgas foi obtido da Estação de Tratamento de Dejetos Suínos (ETDS) da Embrapa Suínos e Aves, e o inóculo das microalgas foi coletado na lagoa facultativa do sistema de tratamento de dejetos suínos. Inicialmente, o inóculo foi submetido a um peneiramento (ASTM 170) para retenção de material grosseiro, e em seguida passou por um período de aclimação em um fotobiorreator. Como se tratava de uma cultura natural, foi observada a predominância de várias espécies de microalgas, conferindo um status de “consórcio” de microalgas.

Os volumes máximos de efluentes utilizados foram previamente testados a fim de não provocar inibição do crescimento das microalgas pelo substrato (MICHELON, 2015). As microalgas foram cultivadas em reservatório circular de 500 L (\varnothing 121,2 cm e altura de 58,4 cm) (Figura 1) sob a luz natural (variação de $90-733 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ambiente, variando de 15,4 a 48°C. Esses reservatórios foram mantidos sob agitação contínua (Bombetec, BMX 1.0 DR).



Fotos: William Michelon

Figura 1. Reator utilizado para cultivo de microalgas sob condições naturais.

Os experimentos foram realizados em batelada alimentada usando digestato não esterilizado de um efluente suinícola a partir de um reator anaeróbico (UASB – Anaerobic Upflow Sludge Blanket) e 30% (v/v) do inóculo de microalgas ($\cong 70 \text{ mg L}^{-1}$ em massa seca), diluídos em água. A possibilidade de engenharia metabólica fornece uma ferramenta importante para estudos da composição celular de microalgas cultivadas com água residuária da suinocultura. Após sete dias da inoculação, 400 litros de meio de cultura contendo biomassa de microalgas foram colhidos por centrifugação (T10, EVODOS, Holanda) e as células foram res-suspensas em 400 L de água privada de nutrientes. Após 25 dias, as células foram colhidas por centrifugação e a biomassa coletada para análise posterior.

Após a colheita, o material foi centrifugado (4.200 rpm, por 30 min) para desidratação, congelado e liofilizado (LJI-030, JJ Científica, Brasil) para os testes de composição química e toxicologia.

Composição química celular

O cultivo foi realizado utilizando efluente do UASB (6% v/v), por um período de sete dias. Após esse período de crescimento, a cultura de microalgas foi separada. Posteriormente à separação, as células foram novamente ressuspendidas em água, livre de nutrientes. Após 25 dias sob privação de nutrientes, o cultivo foi centrifugado e a biomassa coletada.

A visualização dos microrganismos envolvidos no processo foi acompanhada por microscopia (Eclipse E200, Nikon, Japão) equipado com uma câmera Moticam 1000 1.3 MP.

Determinação de Na e K

A determinação analítica de Na e K foi realizada por fotometria de emissão, baseada no método oficial 956.01 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995) e nos procedimentos 3500-Na e 3500-K conforme Rice *et al.* (2012). A quantificação dos elementos foi realizada por aspiração direta da solução da amostra em um fotômetro de chama (B462, Micronal, Brasil). O equipamento foi operado com chama de ar comprimido-GLP (pressão de ar: 12,5 psi) e com taxa de aspiração média de 6 mL min⁻¹. A detecção das emissões do Na e K foram realizadas, respectivamente, a 589 e 766 nm.

Determinação de P

A determinação da concentração de P foi realizada conforme o método 4500-P do ácido ascórbico (RICE *et al.*, 2012).

Determinação de Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn

A determinação dos elementos Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn foi feita por espectrofotometria de absorção atômica em chama (EAA SpectrAA 220, Varian, Austrália) baseada no método oficial 975.03 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995). A quantificação dos elementos foi realizada por aspiração direta da solução da amostra. O equipamento operou com chama de ar comprimido-acetileno e com taxa de aspiração média de 7 mL min⁻¹.

Determinação de lipídios

O procedimento analítico para a determinação de extrato etéreo foi baseado no método oficial Am 5-04 (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 2004). A amostra foi extraída com éter de petróleo (faixa de destilação de 30 a 70°C) sob alta pressão a 90°C por 90 min em sistema Ankom XT15 (Macedon, USA), e o conteúdo de extrato etéreo (constituído, predominantemente, por triacilgliceróis) foi determinado indiretamente por gravimetria.

Determinação do perfil de ácidos graxos

Os lipídios foram extraídos com diclorometano e metanol, e em seguida o extrato foi tratado com hidróxido de sódio e metanol. Os ésteres formados foram determinados por cromatografia a gás com detector por ionização em chama (GC-FID CP-3800, Varian, EUA) e detectados por ionização em chama (fluxo de H₂ de 30 mL/min e fluxo de ar de 300 mL, min). A separação foi realizada com uma coluna capilar sílica fundida (CP Sil 88, com 50 mm de comprimento 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 m de espessura de filme CP7489, Varian, EUA). Nitrogênio ultrapuro foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,6 mL/min. A identificação dos ésteres metílicos foi baseada na comparação dos tempos de retenção da amostra com os padrões autênticos (47885-U Supelco® 37 Component FAME Mix, 47015-U Supelco PUFA nº 2 Animal Source) (ZENEBO *et al.*, 2008).

Determinação de proteínas

O teor de proteína bruta nas células das microalgas foi determinado utilizando o método indireto descrito por Becker (2008). Para tanto, foi utilizada a correlação do "conteúdo de proteína = conteúdo de nitrogênio × 6,25" que descreve a relação entre o teor de proteína e nitrogênio. A concentração de N foi determinada em analisador FP-528 (Leco, USA), gerenciado através do software Leco FP-528.

Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos foi calculada pela diferença total da matéria seca, de acordo com Bi e He (2013).

Determinação de cinzas

O procedimento analítico para determinação do conteúdo de cinzas (matéria mineral) foi realizado por gravimetria, baseado no método nº 36 (COMPÊNDIO..., 2009). Para a caracterização das cinzas (Na, K, P, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn), todas as amostras foram submetidas à solubilização ácida (10 mL de HCl (aq.) 6 mol/L, solubilizada por aquecimento em chapa a 80-90°C), de acordo com o método oficial 965.09 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995) e no procedimento nº 38 (COMPÊNDIO..., 2009).

Testes toxicológicos

O delineamento experimental dos testes toxicológicos foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim, e recebeu parecer favorável em 10 de julho de 2015, frente à Lei Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Lise celular mecânica

Conforme citado por Becker (2008), as proteínas algais não são eficientemente utilizadas quando ingeridas com as células intactas em humanos ou animais monogástricos, sendo necessário então, métodos para o rompimento celular. Devido à utilização da via intraperitoneal (i.p.) e via gavagem, foi estabelecido como veículo de administração a solução salina 0,9%, por se tratar de uma substância isotônica, que mantém o equilíbrio osmótico dos camundongos (ÉVORA *et al.*, 1999).

Foram pesadas subamostras de 0,005 g de material liofilizado e ressuspendido em 15 mL de solução salina 0,9% em tubos falcon. O material foi levado à sonicação (QSonica Ultrasonic Processor Q700) para lise celular em banho de gelo, para evitar o aquecimento e, conseqüentemente, possível alteração bioquímica da amostra.

A configuração do equipamento de sonicação foi mantida em amplitude de 50%, onde foram avaliados diferentes tempos de lise mecânica: 20, 30, 40, 50, e 420s. Após o tempo de sonicação, as amostras contendo as células foram centrifugadas a 2.500 rpm por 5 min. Foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante do extrato de microalgas em cubeta de quartzo (espectrofotômetro UV/VIS, Lambda EZ150, Perkin Elmer, EUA), em varredura entre os comprimentos de onda de 190 e 600 nm, e determinado 570 nm como o comprimento de onda de leitura das amostras para comparação dos tempos de extração (LOURENÇO, 2006).

Ensaio da toxicidade aguda

Para os testes foram utilizados camundongos machos Swiss, pesando entre 30 e 35 g, com 60 dias de idade, oriundos do biotério da URI/Erechim. Para a definição das doses utilizadas neste experimento, foi realizado um estudo piloto, a fim de identificar a menor dose do extrato de microalgas que causasse toxicidade evidente tanto pela via i.p. quanto via gavagem. O estudo de toxicidade foi baseado na metodologia da ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2001) e conforme as diretrizes 420, 423 e 425.

A partir do estudo piloto, os camundongos foram divididos em cinco grupos, conforme segue: o grupo controle CTL1 (n = 3), que recebeu solução salina 0,9%, via i.p. e o grupo controle CTL2 (n = 3) que recebeu solução salina, via gavagem; o grupo Experimental 1 (EXP1) (n = 5), que recebeu o extrato de microalgas na dose de 1.500 mg kg⁻¹, via i.p.; o grupo Experimental 2 (EXP2) (n = 5), na dose de 2.500 mg kg⁻¹, via i.p.; e o grupo Experimental 3 (EXP3) (n = 5), na dose de 2.500 mg kg⁻¹, via gavagem.

Após a administração do extrato, foram realizadas observações clínicas comportamentais, segundo Malone e Robichaud (1983), nos tempos de 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 8h, e depois diariamente, até o terceiro dia. Foram anotados os sinais de toxicidade, além da época de seu aparecimento, intensidade, duração e progresso dos mesmos, os quais foram tabulados em uma escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso). O peso corporal, consumo de água e ração também foram observados. Os animais sobreviventes foram previamente anestesiados com Zoletil IM50 para posterior eutanásia em câmara de CO₂. Após a eutanásia, foi realizada a avaliação macroscópica dos órgãos, além da pesagem de fígado, rim, baço e cérebro total para determinação dos pesos absolutos e relativos.

Ensaio da toxicidade subcrônica

Com base nos resultados dos testes iniciais (piloto) de toxicidade aguda, foi delineado o experimento de toxicidade subcrônica. Para os testes subcrônicos, também foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss, pesando entre 30 e 40 g, com 60 dias de idade, oriundos do biotério da URI – Campus Erechim. Os animais foram divididos em três grupos, conforme segue: grupo controle (CTL3) (n = 8), que recebeu solução salina 0,9%, na dose de 10 mL kg⁻¹; grupo EXP 4 (n = 8), que recebeu o extrato de microalgas na dose de 1.500 mg kg⁻¹; e o grupo EXP 5 (n = 7), que recebeu o extrato de microalgas na dose de 2.500 mg kg⁻¹, todos via gavagem. A administração dos três grupos ocorreu diariamente, durante 30 dias.

Foram realizadas observações clínicas comportamentais segundo Malone e Robichaud (1962) e as mesmas registradas a cada sete dias. Sinais de toxicidade, a época do seu aparecimento, a intensidade, a duração e a progressão dos mesmos foram anotados, tabulando-as numa escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso), para posterior análise. Durante o experimento, foram analisados e anotados, a cada sete dias, o peso corporal e o consumo de água e ração dos animais dos diferentes grupos. Após a eutanásia, o abdômen foi incisado para a

avaliação macroscópica dos órgãos e coleta do fígado, rim, baço e cérebro para determinar os pesos absolutos e relativos.

Análise estatística

Foi realizado o tratamento estatístico através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism6®. A análise estatística dos dados morfológicos e histológicos foi realizada pelo teste de distribuição não paramétrica Kruskal Wallis do Bioestat 5.3, seguido do teste Student-Newman-Keuls. Considerou-se um nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos através de média \pm desvio padrão (Média \pm DP).

Resultados e Discussão

Identificação e composição celular das microalgas

O consórcio de microalgas usado como inóculo foi obtido diretamente a partir de uma lagoa facultativa utilizada como processo de tratamento terciário para remover nutrientes de um efluente previamente digerido das instalações da Embrapa Suínos e Aves. A análise microscópica revelou a predominância de *Chlorella* spp. e *Scenedesmus* spp. no inóculo (Figura 2).



Fotos: William Michelson

Figura 2. Fotomicrografia do consórcio de microalgas (1000X): (A) *Chlorella* spp. (B) *Scenedesmus* spp.

O gênero *Scenedesmus* pertence ao grupo das clorófitas, são algas de superfície e vivem bem em águas com elevado teor mineral. *Scenedesmus* é comumente usado na biotecnologia em culturas para a produção de biomassa para ração animal, suplemento alimentar e biofixação de CO₂ (RADMANN, 2007). Esta espécie possui um conteúdo de aminoácidos essenciais superior ao apresentado por alimentos convencionais e, ainda, apresenta níveis de proteína entre 25 e 65%, o que a transforma em uma atrativa fonte de proteínas (QUEVEDO *et al.*, 2008). A *Chlorella* é uma microalga unicelular, encontrada em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar fotossíntese. É uma microalga rica em clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais e que apresenta alta capacidade de fixação de CO₂, é resistente a altas temperaturas e tolerante a SO₂ e NO (RADMANN, 2007). É uma das espécies vendidas como suplemento alimentar (PEREIRA *et al.*, 2012), a qual é correlacionada a diversos benefícios na saúde (BECKER, 2008).

A concentração de N e P afeta a acumulação de lipídios no interior das células. Este fenômeno é particularmente interessante para melhorar a nossa compreensão atual do metabolismo e variações fisiológicas em microalgas como resultado de mudanças no meio de cultura, especialmente a partir de efluentes de águas residuais. Os lipídios e carboidratos são dois grandes grupos de compostos de carbono de armazenamento de energia que aparecem nas células de microalgas, em resposta a condições de estresse (SIAUT *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2014). A composição química das células privadas de nitrogênio e fósforo por 25 dias mostrou 22%, 56,8% e 16,3% de proteínas, carboidratos e lipídios, respectivamente. Particularmente para a concentração de lipídeos, foi observado um aumento de cerca de cinco vezes após privação de nutrientes em relação ao material sem estresse nutricional (MICHELON *et al.*, 2015). A biomassa privada de N e P proporcionou 4,8% em cinzas, tal matéria sendo rica em P (7.361 mg kg⁻¹, ou 0,8%) e K (5.838 mg kg⁻¹, ou 0,6%) de acordo com a Tabela 2, que mostra a composição mineral da biomassa do consórcio.

O esgotamento do nitrogênio leva a um aumento no teor de lipídios ou carboidratos, pois isso as obriga a converterem clorofila e proteína/peptídeos para lipídios/carboidratos em resposta ao ambiente extremo (JI-AN-MING *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014). Quando as condições de cultura mudam, estas microalgas também podem ter a capacidade de sofrer mudanças programáticas na partição do carbono fotossintético e composição química (DEAN *et al.*, 2010).

Tabela 2. Composição mineral da biomassa do consórcio de microalgas (em mg kg⁻¹).

Ca	Mg	P	Cu	Zn	Mn	Fe	Na	K
2.968	2.466	7.361	41,58	550,48	130,73	3.312,05	332	5.838

Resultado semelhante foi demonstrado por Chu *et al.* (2014), que estudaram o cultivo com microalga *Scenedesmus obliquus*, onde a concentração de proteínas foi rapidamente reduzida de 52,8% para um valor médio de 17,9%, o nível de carboidratos aumentou 25,6% e o acúmulo de lipídios foi incrementado de 13 para 35% com privação de N e P por um período de 16 dias. A acumulação de lipídios acompanhada por aumento de carboidratos foi também observada em outras espécies de microalgas, tais como *S. obliquus*, *Chlorella zofingiensis*, *Phaeodactylum tricorutum* e *Neochloris oleoabundans*, e todos, sem exceção, mostraram que a acumulação de lipídios ficou aquém dos carboidratos (BREUER *et al.*, 2012).

O conteúdo e a composição dos lipídios e ácidos graxos em microalgas, além de ser espécie-específico, podem ser influenciados por fatores como luz, temperatura, concentração de nutrientes e concentração de dióxido de carbono (KRZEMIŃSKA *et al.*, 2015; TALEBI *et al.*, 2013). Na Tabela 3, são apresentadas as concentrações de ácidos graxos saturados, ácidos graxos insaturados e ácidos graxos poli-insaturados, em relação ao total dos ácidos graxos analisados, após 25 dias de cultivo com privação de nutrientes. Os ácidos palmíticos (C16:0), cis-oleico (C18:1n9c), cis-linoleico (ω -6) (C18:2n6c) e α -linolénico (ω -3) (C18:3n3_Alfa) estão entre os ácidos mais abundantes encontrados no

consórcio, representando uma concentração de 26,9%, 34,8%, 8,1% e 17,1%, respectivamente.

Ácidos graxos, como ômega-3, representam um importante componente estrutural das membranas celulares humanas, particularmente células neurais. O consumo desse suplemento tem demonstrado a prevenção de doenças cardiovasculares, nos sistemas nervosos e inflamatórias. Com relação à saúde cardiovascular, o consumo regular de ω -3 e ácidos graxos podem ajudar a reduzir o risco de hipertensão, trombose, enfarte do miocárdio e arritmias cardíacas (SIJTSMA; SWAAF, 2004; BRUNNER, 2006; HORROCKS; YEO, 1999). Outros estudos mostraram que uma proporção equilibrada de ω 6/ ω 3 na dieta diminui as doses de medicamentos farmacêuticos necessários (SIMOPOULOS, 2002).

Lise celular mecânica

Embora a extração dos compostos das microalgas seja relativamente fácil de ser executada, são usados vários processos para aumentar a eficiência e o rendimento com baixos custos. Além de outros métodos, o tradicional método de sonicação (ultrassom) também é utilizado, com eficiência, para o rompimento da parede celular das algas (MORIOKA, 2014).

Após o procedimento metodológico para a lise celular mecânica, a amostra com o tratamento de sonicação por 50s em solução salina apresentou a melhor desagregação de células e desintegração de parede celular, propiciando uma suspensão homogênea, observado pela maior absorvância (0,174) em consequência da maior liberação do conteúdo intracelular no meio (Figura 3).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos (% em relação aos lipídeos totais) da biomassa do consórcio de microalgas.

Ácido graxo	Fração percentual, %
C12:0	0,02
C14:0	0,5
C14:1	0,1
C15:0	0,5
C16:0	26,9
C16:1	0,4
C17:0	0,3
C17:1	0,2
C18:0	4,6
C18:1n9t	0,06
C18:1n9c	34,8
C18:1n7c	0,03
C18:2n6t	5,3
C18:2n6c	8,1
C18:3n6_Gama	0,2
C18:3n3_Alfa	17,1
C20:0	0,2
C20:1n9c	0,4
C22:0	0,2

De acordo com os resultados obtidos na Figura 3, os tempos de sonicação de 20, 30 e 40s não foram eficazes no rompimento celular, sendo utilizado o tempo de 50s pela maior absorbância em consequência da maior liberação de pigmento. Foi testado mais um tempo de sonicação além dos 50s (420s), sendo observada diminuição na absorbância, provavelmente pela degradação do pigmento mensurado pelo aquecimento da amostra devido ao prolongado tempo de exposição à probe do sonificador.

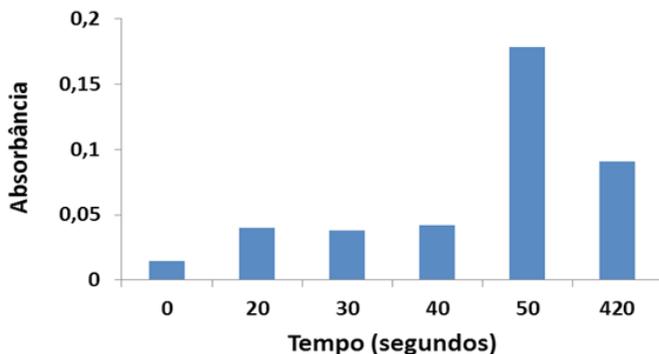


Figura 3. Análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 570 nm do extrato de microalgas em diferentes tempos de sonicação.

Ensaio de toxicidade

Em estudo realizado por Lima *et al.* (2014a), foi descrito um caso de infecção disseminada por *Chlorella* sp. em ovinos, na região semiárida da Paraíba, onde o animal apresentou emagrecimento e aumento de volume abdominal. Em outro estudo, realizado por Maia *et al.* (2015), foi relatado também um caso de hepatite por *Chlorella* sp. em ovinos, o qual apresentava perda de peso progressivo e aumento de volume abdominal e clinicamente observou-se palidez das mucosas, caquexia, dificuldade de manter-se em estação e ascite. Os autores descrevem que na área onde estavam os ovinos havia poços, lagos e bebedouros com água estagnada e esverdeada. Apesar dos benefícios apresentados, diversas microalgas são conhecidas pelo seu potencial toxicológico, sendo necessários mais estudos que avaliem parâmetros de toxicidade.

A avaliação toxicológica da biomassa de algas produzida é uma etapa fundamental para a destinação de uso dessa biomassa. A determinação de uma dose terapêutica segura é de suma importância para o uso de uma droga. Através do cálculo da DL50 (dose letal para 50% da população) é possível calcular o índice terapêutico de uma substância,

fornecendo alguma ideia da margem de segurança no uso da mesma (RANG *et al.*, 2001). No entanto, esse teste foi banido oficialmente em 2002 pela OECD. Com isso, diferentes métodos surgiram para determinação da toxicidade aguda, entre eles o teste da dose fixa, o qual prevê o uso de doses baixas, como 5, 50, 300 e 2.000 mg kg⁻¹ ou excepcionalmente 5.000 mg kg⁻¹ onde, além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificando a toxicocinética e a relação dose-resposta.

Em relação exclusivamente à mortalidade, um resumo dos experimentos de toxicidade (agudo e subcrônico) é mostrado na Figura 4. Porém, é importante ressaltar que o teste da dose fixa tem como objetivo principal a identificação da toxicidade evidente, e não apenas a mortalidade (VALADARES, 2007; CAZARIN *et al.*, 2004).

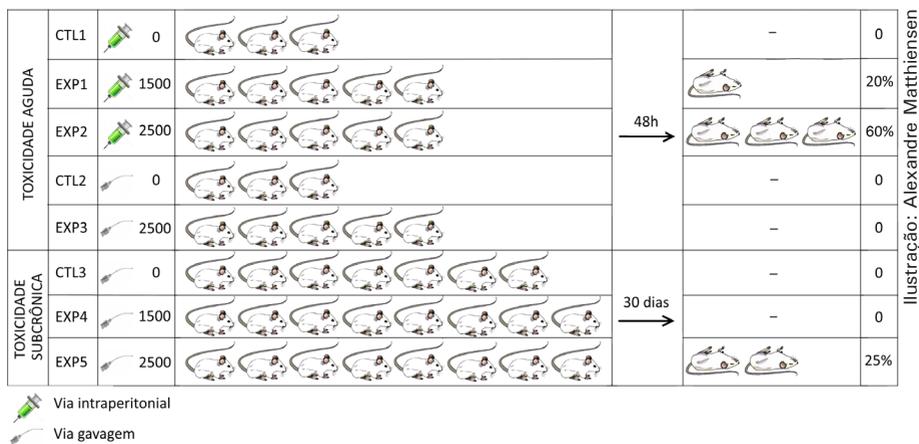


Figura 4. Desenho experimental com as vias de administração, as doses (mg kg⁻¹ de peso corporal), o n amostral, o tempo de exposição e o resultado, em percentual de mortalidade, dos ensaios de toxicidade realizados.

Ensaio de toxicidade aguda

Administração via intraperitoneal

Mortalidade

Analisando o índice de mortalidade (Figura 4) dos ensaios de toxicidade aguda pode ser observado que, após 48 horas da administração do extrato de microalgas na dose de 1.500 mg kg^{-1} , apenas um indivíduo do grupo chegou a óbito ($n=5$), correspondendo a 20%, enquanto na dose de 2.500 mg kg^{-1} três indivíduos morreram (60%).

Sinais clínicos de toxicidade

A Tabela 4 mostra os parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos do experimento de toxicidade aguda via i.p. Dentre os 10 diferentes parâmetros analisados de sinais clínicos de toxicidade (piloereção, lacrimação, diarreia, respiração fraca, funções desequilibradas, redução da atividade motora, imobilidade, inchaço de cabeça e face, lambeção, agonia), somente o eriçamento de pelo, redução da atividade motora e diarreia foram observados.

Analisando o parâmetro de eriçamento de pelo nos 120 e 480 min de experimento foi visto um aumento significativo de escores no grupo EXP2 em relação ao grupo CTL1 ($p=0,009$ e $p=0,003$, respectivamente). Já os animais do grupo EXP1 apresentaram maior intensidade de eriçamento de pelo significativo em relação ao CTL1 nos 240 minutos ($p=0,004$) e 3º dia ($p=0,007$) após a administração.

Foi visto uma redução da atividade motora significativa no grupo EXP2 nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 240 de experimento quando comparado ao grupo CTL1 ($p=0,005$; $p=0,005$; $p=0,005$; $p=0,026$ e $p=0,005$, respectivamente) (Tabela 4). Nos mesmos tempos de experimento, foi observado uma redução significativa da atividade motora do grupo EXP2 em relação ao EXP1 ($p=0,007$; $p=0,007$; $p=0,007$; $p=0,033$ e $p=0,007$, respectivamente).

Na Tabela 4, podemos notar que os animais do grupo EXP1 e EXP2 apresentaram diarreia quando comparado ao grupo CTL1, porém sem haver significância. Esses resultados indicam toxicidade causada pelo extrato de microalgas e que foram de maior intensidade nos animais da dose de 2.500 mg kg⁻¹ (EXP2) em relação aos animais que receberam a dose de 1.500 mg kg⁻¹ (EXP1). Segundo Guerra *et al.* (2000), o eriçamento dos pelos é um indicativo de toxicidade e desconforto físico dos animais, assim como a redução da atividade motora. A diarreia verificada nos animais pode ter sido causada pelos antioxidantes presente nos carotenoides de *Scenedesmus*, microalga componente do extrato administrado nos animais (MOURA *et al.*, 2012; CHU *et al.*, 2011).

Tabela 4. Número de animais indicando a intensidade dos parâmetros de toxicidade (0 = ausente; 1 = raro; 2 = pouco; 3 = moderado; 4 = intenso) nos diferentes grupos do experimento de toxicidade aguda via intraperitoneal.

Parâmetros / Grupo	Tempo	CTL1				EXP1				EXP2				Valor p		
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1		2	3
Piloereção	15 min	3	-	-	-	-	3	1	1	-	-	4	1	-	-	0,518
	30 min	3	-	-	-	-	2	3	-	-	-	4	1	-	-	0,238
	60 min	3	-	-	-	-	4	1	-	-	-	2	3	-	-	0,238
	120 min	3	-	-	-	-	4	-	1	-	-	-	2	3	-	0,029 ^b
	240 min	3	-	-	-	-	-	-	1	4	-	2	-	1	2	0,013 ^a
Redução da atividade motora	480 min	3	-	-	-	-	2	1	2	-	-	-	2	-	3	0,012 ^b
	3° dia	3	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	2	-	0,011 ^a
	15 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5	0,006 ^{bc}
	30 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	5	0,006 ^{bc}
	60 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	2	3	0,007 ^{bc}
Diarreia	120 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	1	-	1	3	0,044 ^{bc}
	240 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	2	1	2	0,007 ^{bc}
	480 min	3	-	-	-	-	4	-	1	-	-	2	-	2	1	0,192
	3° dia	3	-	-	-	-	4	-	-	-	-	1	-	1	-	0,561
	60 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	2	3	-	-	0,172
Diarreia	120 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	2	3	-	-	0,172
	240 min	3	-	-	-	-	5	-	-	-	-	2	1	1	1	0,174
	480 min	3	-	-	-	-	4	1	-	-	-	2	-	3	-	0,172
	3° dia	3	-	-	-	-	3	1	-	-	-	1	-	1	-	0,526

As letras representam diferença significativa entre os grupos com $p < 0,05$, onde ^a do EXP1 com CTL1, ^b EXP2 com CTL1, ^c EXP1 com EXP2.

Peso corporal

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância. As alterações no peso corporal de animais tratados com diversas substâncias têm sido utilizadas como indicadores de efeitos adversos de medicamentos e outros produtos químicos, especialmente se a perda da massa corporal for maior do que 10% do peso inicial (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A partir disso, muitos protocolos recomendam a necessidade de avaliar os índices de toxicidade pela presença de perda de peso corporal, acompanhada ou não de redução do consumo de alimentos, pelos erizados, além de alterações de peso de órgãos (RAMOS *et al.*, 2008).

O peso corporal dos animais no início do tratamento foi: no grupo CTL1 ($33,78 \pm 2,64$); EXP1 ($38,47 \pm 2,71$) e EXP2 ($35,69 \pm 3,56$), e se mostraram semelhantes, o que evita interferência no decorrer do experimento. Analisando a Figura 5, podemos observar perda de peso corporal significativa após três dias de tratamento nos grupos EXP1 e EXP2 em relação ao grupo CTL1 ($p=0,0043$ e $p=0,0095$, respectivamente). Além disso, foi visto uma redução significativa de peso corporal ao longo do tratamento (0-14 dias) no grupo EXP1 em relação ao grupo CTL1 ($p=0,0066$), que de acordo com Teo *et al.* (2002) a redução na massa corporal é um sinal de toxicidade sistêmica.

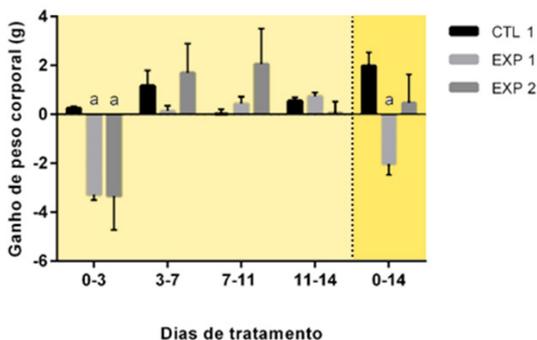


Figura 5. Ganho de peso corporal no experimento via i.p. Resultados referentes a 2-4 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. ^aDiferença significativa em relação ao CTL1.

Vale ressaltar que a análise do peso corporal foi realizada com quatro animais no grupo EXP1 e dois animais no grupo EXP2 em função da mortalidade após 48h da administração do extrato. Por isso, as diferenças no ganho de peso entre os animais do grupo EXP1 com EXP2 não podem ser comparadas, já que o índice de mortalidade do grupo EXP1 foi menor que do EXP2, quando os animais sobreviventes podem ter criado resistência metabólica à dose do extrato de microalgas e, portanto, recuperado o peso perdido.

Consumo de ração e água

Segundo Mukinda e Eagles (2010), a análise do consumo de alimentos e água em uma experimentação animal é importante para investigar a segurança das substâncias estudadas com intuito terapêutico, pois além da redução do desenvolvimento ponderal a toxicidade sistêmica se manifesta através da redução destes consumos. Desta forma, as análises de controle de consumo de água e ração foram realizadas visando detectar uma possível toxicidade do extrato utilizado.

Analisando a Figura 6, o consumo de ração dos animais dos grupos experimentais no decorrer do experimento foi similar ao do grupo controle, com exceção dos últimos dias (11^o ao 14^o), onde foi visto redução significativa do consumo de ração no grupo EXP1 em relação aos grupos CTL1 ($p < 0,0001$) e EXP2 ($p < 0,0001$). Quando analisado o consumo de ração ao longo do experimento (0-14 dias), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. A maior variabilidade dos resultados do EXP2 (expresso no desvio padrão) deve-se ao menor número amostral ($n = 2$) após 48h, devido à maior mortalidade.

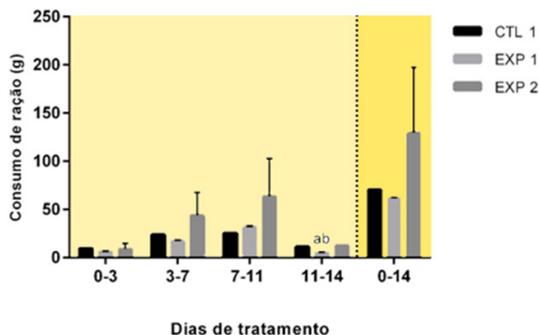


Figura 6. Consumo de ração no experimento via i.p. Resultados referentes a 2-4 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. ^aDiferença significativa em relação ao CTL1; ^bdiferença significativa em relação ao EXP2.

A Figura 7 mostra o consumo de água durante o experimento pelos grupos. Podemos notar uma redução constante, no decorrer do experimento, no consumo de água no grupo EXP1 em relação ao grupo CTL1 e EXP2, mas com significância nos dias 3 a 7 ($p=0,0003$; $p=0,0005$, respectivamente) e nos últimos dias de tratamento no grupo EXP1 entre o grupo CTL1 (11^o ao 14^o) ($p=0,006$).

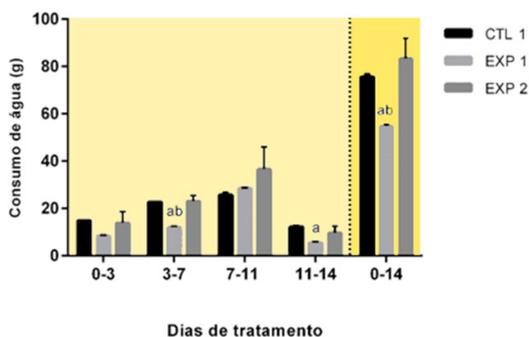


Figura 7. Consumo de água no experimento via i.p. Resultados referentes a 2-4 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. ^aDiferença significativa em relação ao CTL1; ^bdiferença significativa em relação ao EXP2.

Ao longo do tratamento (0-14 dias), pode ser observada diferença significativa entre o grupo EXP1 em relação ao CTL1 ($p=0,0047$) e em relação ao EXP2 ($p=0,0018$), o que corrobora com os dados do peso corporal e consumo de ração mostrando sinais de toxicidade no grupo tratado com o extrato de microalgas na dose de 1.500 mg kg^{-1} . Porém, ressalta-se que a administração de uma única dose de 2.500 mg kg^{-1} é considerada altamente tóxica em função do índice de mortalidade nos primeiros dias de tratamento, sendo que os resultados do consumo de água no final do experimento são representativos dos únicos dois animais sobreviventes, não sendo, portanto, passíveis de comparação.

Peso absoluto e relativo dos órgãos

Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais. Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (CUNHA *et al.*, 2009).

Nas Figuras 8 e 9, podem ser observados os pesos dos órgãos dos animais nos diferentes grupos ao final do experimento. Na Figura 8, foi visto um aumento significativo no peso absoluto do baço dos animais do grupo EXP1 quando comparados ao CTL1 ($p=0,0357$). Também vale ressaltar um aumento no peso absoluto do fígado dos animais do grupo EXP1 e EXP2 em relação ao CTL1, no entanto, sem diferença significativa. Conforme mostra a Figura 9, os resultados foram semelhantes ao peso absoluto, onde foi constatado aumento significativo no peso relativo do baço dos animais no grupo EXP1 em relação aos grupos CTL ($p=0,0216$). Constatou-se, ainda, uma tendência no aumento do peso relativo do fígado dos animais do grupo EXP1 e EXP2 em relação ao CTL, o que pode estar relacionado com a metabolização dos compostos exógenos, podendo apresentar quadros de hepatomegalia (SCHINONI, 2006).

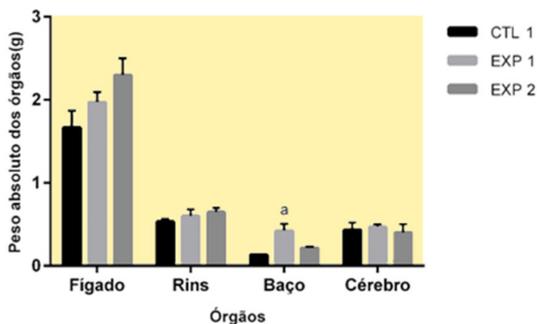


Figura 8. Peso absoluto dos órgãos no experimento via i.p. Resultados referentes a 2-4 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. ^aDiferença significativa em relação ao CTL1.

O aumento significativo do baço dos animais que receberam a dose de 1.500 mg kg^{-1} pode ser justificado pela presença da microalga *Chlorella* no extrato administrado nos camundongos que, de acordo Milledge (2011) e Barrow e Shahidi (2007), apresenta em sua composição uma substância ativadora da resposta imune que possui a capacidade de aumentar a proliferação de esplenócitos. Esse aumento da resposta imune pode ser benéfico se em doses moderadas. No entanto, o aumento do peso relativo verificado no baço pode ter sido provocado pela retenção de um alto nível de hemácias, produzindo um quadro semelhante ao choque hemorrágico, onde além do aumento do volume do órgão, provoca também queda da hemoglobina (ZAGO; PINTO, 2007), mostrando ser uma dose tóxica em camundongos. Para a utilização do extrato como uma alternativa no aumento da resposta imune, devem ser realizados maiores estudos em doses menores.

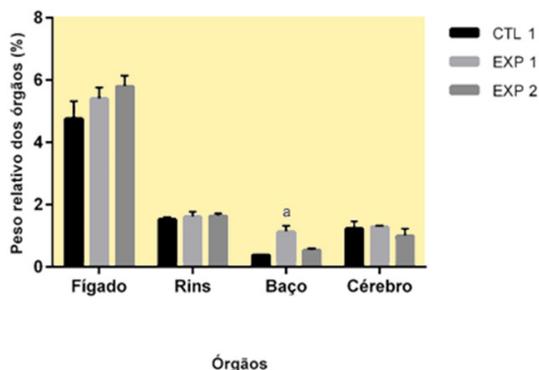


Figura 9. Peso relativo dos órgãos no experimento via i.p. Resultados referentes a 2-4 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. ^aDiferença significativa em relação ao CTL1.

Administração via gavagem

A administração do extrato de microalgas na dose de 2.500 mg kg^{-1} pela via gavagem, no experimento de toxicidade aguda, não levou a óbito nenhum camundongo no período de 14 dias (Figura 4).

Sinais clínicos de toxicidade

A Tabela 5 mostra os parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos. Dentre os diferentes parâmetros analisados, somente o eriçamento de pelo e redução da atividade motora foram constatados.

Em relação ao eriçamento de pelos, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos. No entanto, foi visto uma redução significativa da atividade motora no grupo EXP3 em relação ao CTL2 nas duas primeiras horas após a administração do extrato. Para pesquisas de toxicidade, somente um parâmetro, como a redução da atividade motora, não é suficiente para determinar a toxicidade da dose de 2.500 mg kg^{-1} do extrato de microalgas via gavagem, sendo necessária a avaliação por outros protocolos (SILVA *et al.*, 2016).

Tabela 5. Número de animais indicando a intensidade dos parâmetros de toxicidade (0 = ausente; 1 = raro; 2 = pouco; 3 = moderado; 4 = intenso) nos diferentes grupos do experimento de toxicidade aguda via gavagem.

Parâmetros / Grupo	Tempo	CTL2				EXP3				Valor p		
		0	1	2	3	4	0	1	2		3	4
Piloereção	15 min	3	-	-	-	-	3	2	-	-	-	0,272
	30 min	3	-	-	-	-	3	2	-	-	-	0,272
	240 min	3	-	-	-	-	3	-	2	-	-	0,272
	480 min	3	-	-	-	-	3	2	-	-	-	0,272
Redução da atividade motora	3° dia	3	-	-	-	-	4	-	1	-	-	0,583
	30 min	3	-	-	-	-	3	2	-	-	-	0,272
	60 min	3	-	-	-	-	1	-	3	1	-	0,021 ^a
	120 min	3	-	-	-	-	1	-	4	-	-	0,016 ^a
Redução da atividade motora	240 min	3	-	-	-	-	2	-	-	2	1	0,075
	480 min	3	-	-	-	-	3	-	2	-	-	0,272

Os dados são significativos quando $p < 0,05$, ^adiferença significativa em relação ao CTL2.

Peso corporal

Parâmetros metabólicos, como o consumo de água e alimentos e avaliação do ganho de peso, devem ser analisados para investigação da toxicidade sobre o sistema gastrointestinal, já que a ingesta dos mesmos é essencial para o funcionamento adequado do sistema fisiológico dos animais, além de que as condições nutricionais impróprias podem acarretar na deficiência do organismo (FERREIRA, 2015; STEVENS e MYLE-CRAIN, 1994).

O peso corporal no início do tratamento no grupo CTL2 ($33,78 \pm 2,64$) e EXP3 ($35,73 \pm 4,09$) mostraram semelhanças, o que evita interferência no decorrer do experimento. Conforme mostra a Figura 10, não houve diferença significativa entre os grupos no ganho de peso corporal ao longo do experimento, porém os animais do grupo EXP3 tiveram menor ganho de peso durante a primeira semana de tratamento em relação ao grupo CTL, mas com recuperação até o final do experimento.

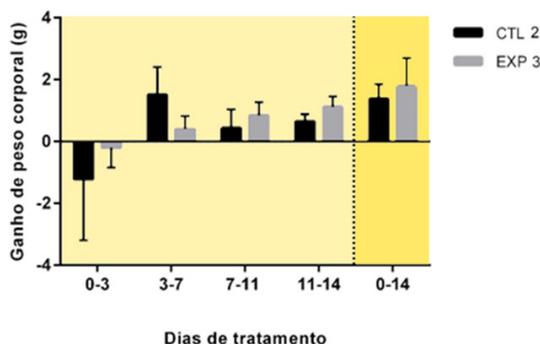


Figura 10. Ganho de peso corporal no experimento via gavagem. Resultados referentes a 3-5 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

Consumo de ração e água

O consumo de ração dos animais está representado na Figura 11. Pode ser observada similaridade no consumo de ração no grupo EXP3 em relação ao CTL2, o que permite constatar ausência de toxicidade do extrato de microalgas para este parâmetro. É possível supor, ainda, que o extrato de microalgas poderia servir como um suplemento por conter em sua composição proteínas, carboidratos e lipídios. Segundo Hernandez e Nahas (2003) e Araujo e Navarro (2012), a ingestão excessiva de suplementos que contenham em sua composição proteínas, carboidratos ou lipídios pode provocar aumento de peso, não fornecendo benefícios para o ganho de massa muscular adicional e o aumento do desempenho físico. Entretanto esse resultado não confirmou a alegação de que a microalga *Chlorella*, presente no extrato administrado pode ser utilizada como inibidor de apetite (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Pabst *et al.* (1976) verificaram o aumento de peso corporal seguido do aumento no consumo de ração em ratos que receberam uma dieta contendo 20% da microalga *Scenedesmus obliquus* por 12 semanas. Venkataraman *et al.* (1977; 1980) verificaram, em estudo com ratos, maior consumo de ração e aumento no peso corporal do grupo que recebeu a dieta com 20% de *Scenedesmus obliquus*, seguida do grupo de 15% e 10%, ao longo de 12 semanas.

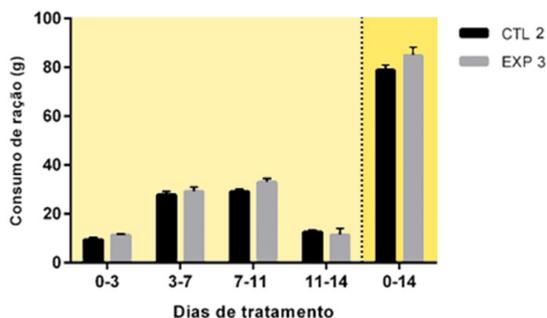


Figura 11. Consumo de ração no experimento via gavagem. Resultados referentes a 3-5 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

O consumo de água pelos animais (Figura 12) mostrou um aumento significativo do grupo EXP3 em relação ao CTL2 nos três primeiros dias de tratamento ($p=0,001$). Esse aumento no início do experimento resultou no aumento significativo no consumo de água total do grupo EXP3 em relação ao CTL2 ($p=0,0005$).

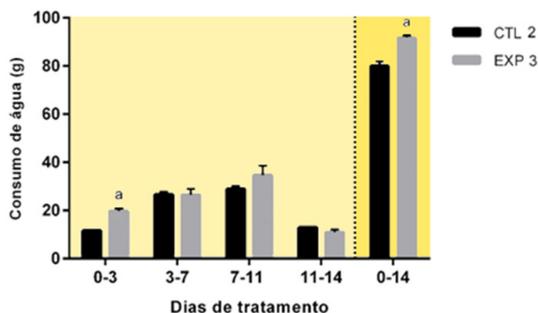


Figura 12. Consumo de água no experimento via gavagem. Resultados referentes a 3-5 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. ^aDiferença significativa em relação ao CTL2.

Peso absoluto e relativo dos órgãos

Não se observou diferença significativa de pesos dos órgãos em nenhum grupo (dados não mostrados).

Frente aos resultados do grupo tratado com o extrato de microalgas pela via gavagem, quanto aos sinais clínicos de toxicidade, apesar de haver redução da atividade motora nas primeiras horas após a administração do extrato, os dados de consumo de ração, água, ganho de peso corporal e peso absoluto e relativo dos órgãos não demonstraram alterações de toxicidade, mas devem ser considerados se o objetivo da pesquisa for a utilização do extrato para fins farmacológicos.

Esse conjunto de resultados comparando as vias de administração (intraperitoneal e gavagem) comprovou que o extrato de microalgas na dose de 2.500 mg kg^{-1} se apresentou tóxico pela via i.p. Por outro lado, pela via gavagem, nesta mesma dose, não foi verificado letalidade. No entanto, não se mostrou totalmente seguro para estudos farmacológicos.

A utilização da gavagem pode ser influenciada pelo esvaziamento gástrico, que pode levar a efeitos opostos na absorção de ácidos e bases fracas causadas pela diferença de pH no estômago e no intestino. No entanto, se o esvaziamento gástrico é retardado, a assimilação da maioria dos nutrientes é reduzida, devido à grande superfície de absorção do intestino. A mesma pode ser afetada inclusive pela solubilidade nos líquidos gastrointestinais e a concentração da substância administrada, já que está relacionada as alterações no pH do trato gastrointestinal (TGI), flutuações na motilidade do TGI, alterações na permeabilidade da membrana intestinal e também interação com o alimento (BARROS; BARROS, 2009). Conforme esses autores, a administração pela via intraperitoneal disponibiliza uma grande superfície de absorção, na qual as substâncias entram rapidamente na circulação, onde parte da substância passa pelo fígado, sofrendo metabolização antes de atingir a circulação sistêmica.

Alguns autores também constataram a diferença nos resultados de toxicidade ao comparar a via intraperitoneal e a via gavagem, no entanto, utilizando extratos de plantas. Silva (2006) testou a toxicidade aguda do extrato etanólico de *Caesalpinia echinata* via intraperitoneal, nas doses de 250 a 2.000 mg kg^{-1} , e por via oral nas doses de 250 a 4.000 mg/kg , verificando 100% de letalidade na dose de 2.000 mg kg^{-1} pela via intraperitoneal, enquanto que pela via oral não foi constatado óbito em nenhuma das doses testadas até 4.000 mg/kg . Essa ausência de letalidade pode estar relacionada aos mecanismos farmacocinéticos de absorção e/ou biotransformação, que possivelmente diminuíram os níveis séricos necessários para provocar efeito letal nos indivíduos. No estudo de Lima *et al.* (2014b) foram administradas três doses via oral

e cinco doses via i.p. do extrato etanólico de *Pithecellobium cochliocarpum*. Algumas reações foram constatadas no grupo de administração oral, porém não letais até a dose de 5.000 mg kg⁻¹, enquanto a DL₅₀ para a via i.p. foi 257,5 mg kg⁻¹, considerado muito tóxico.

Ensaio de toxicidade subcrônica

Mortalidade

Verificou-se a morte de dois animais do grupo EXP5, que recebeu extrato de microalgas na dose de 2.500 mg kg⁻¹, as quais ocorreram no 3º e no 24º dia de exposição, o que representa um índice de mortalidade de 25% neste grupo, sugerindo que o extrato microalgáceo pode ser tóxico na maior dose administrada durante o tratamento subcrônico de 30 dias. Nos demais grupos CTL3 e EXP4, o qual recebeu o extrato de microalgas na dose de 1.500 mg kg⁻¹, não foram registradas mortes durante o experimento subcrônico (Figura 4).

Sinais clínicos de toxicidade

A Tabela 6 mostra os parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos. Dentre os dez diferentes parâmetros analisados, somente piloereção foi constatada. Avaliando os diferentes dias de tratamento, somente no 21º dia é que foi visto maior intensidade de piloereção significativa nos animais do grupo EXP4 em relação ao grupo CTL3. Salienta-se que somente este dado não é suficiente para determinar a toxicidade da dose do extrato de microalgas, pois é necessário o conjunto de diferentes parâmetros de avaliação e protocolos (SILVA *et al.*, 2016).

Tabela 6. Número de animais indicando a intensidade dos parâmetros de toxicidade (0 = ausente; 1 = raro; 2 = pouco; 3 = moderado; 4 = intenso) nos diferentes grupos do experimento de toxicidade subcrônica.

Parâmetros / Grupo	Dias	CTL3				EXP4				EXP5				Valor p			
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1		2	3	4
Piloereção	1	8	-	-	-	-	7	1	-	-	-	4	1	-	-	-	0.8247
	7	8	-	-	-	-	6	2	-	-	-	4	1	-	-	-	0.6773
	14	8	-	-	-	-	6	2	-	-	-	4	-	1	-	-	0.6842
	21	8	-	-	-	-	-	4	3	1	-	1	-	3	1	-	*0.0020
	30	8	-	-	-	-	6	2	-	-	-	3	2	-	-	-	0.4605

Os dados são significativos quando $p < 0,05$, * diferença significativa em relação ao CTL3.

Peso corporal

Durante a administração do extrato, o peso corporal foi analisado a cada sete dias. De acordo com a Figura 14, os pesos corporais dos animais, nos diferentes grupos, no início do tratamento, se mostraram semelhantes, o que evita interferência no decorrer do experimento. Na Figura 13, pode-se observar uma redução significativa no ganho de peso corporal dos camundongos do grupo EXP4 logo no início do tratamento (1° ao 7° dia) em relação ao CTL3, mas que esta perda foi recuperada no período seguinte (7° ao 14° dia), porém sem diferença significativa. Entretanto, observando os resultados obtidos ao longo de todo o tratamento (1° ao 30° dia), pode-se observar uma redução significativa no ganho de peso corporal, tanto do grupo que recebeu o extrato de microalgas na dose de 1.500 mg kg⁻¹, como no grupo que recebeu o extrato na dose de 2.500 mg kg⁻¹ em relação ao grupo CTL3. Estes resultados sugerem que o extrato microalgal nas doses de 1.500 e 2.500 mg kg⁻¹ pode causar indícios de toxicidade no tratamento subcrônico de 30 dias, baseado na informação de que a redução na massa corporal é um sinal de toxicidade sistêmica (TEO *et al.*, 2002).

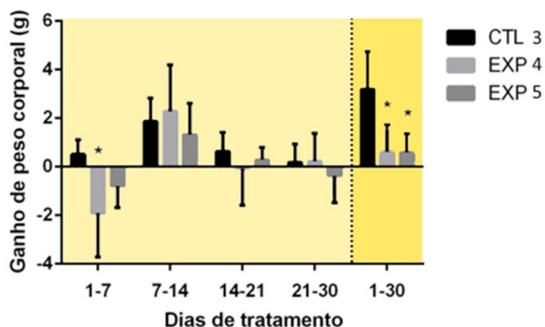


Figura 13. Ganho de peso corporal no experimento de toxicidade subcrônica. Resultados referentes a 7-8 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. *diferença significativa em relação ao grupo CTL3.

Vários estudos com *Chlorella* vêm demonstrando efeitos farmacológicos, se utilizadas com cautela. Nesse sentido, esta alga unicelular de água doce rica em nutrientes e comumente utilizada como suplemento alimentar surge como alternativa terapêutica e profilática para a obesidade. Estudo clínico e experimental realizado por Vecina *et al.* (2014) em ratos obesos demonstrou que a administração de *Chlorella vulgaris* pode regularizar os níveis séricos de colesterol e de glicose e reduzir a hipertensão e, ainda, impede o alto teor de gordura induzida por dieta, reduzindo triglicérides, colesterol e níveis de ácidos graxos livres. Neste estudo de Queiroz e colaboradores, foram encontrados valores significativamente menores de glicemia, determinados pelos testes de tolerância à glicose e à insulina, e que foram observados nos animais obesos tratados com *Chlorella vulgaris*, sugerindo melhora na sensibilidade à insulina. Outros estudos da administração da *Chlorella vulgaris* em animais demonstraram efeitos benignos no nível de inúmeras funções bioquímicas, tais como efeito antioxidante e diminuição dos níveis de glicose em roedores diabéticos (DUARTE, 2010). Estudos realizados em coelhos revelaram melhoramentos na atividade anti-inflamatória e diminuição dos níveis de colesterol após suplementação com esta espécie de microalga (LEE *et al.*, 2010).

Segundo Duarte (2010), a suplementação em dietas com níveis de PUFA (ácidos graxos poli-insaturados), presentes em diversas espécies de microalgas, parece ter um efeito benéfico, como demonstrado por diversos autores em doenças como a artrite reumatoide, doença de Chron, fibrose cística, obesidade, aterosclerose, entre outras. Simultaneamente, a síntese de carotenoides pela maioria das microalgas é, também, um caminho possível para um suplemento dietético.

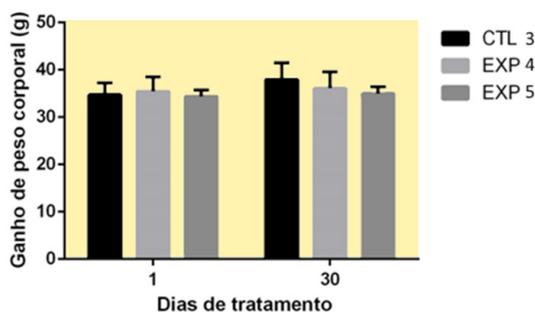


Figura 14. Análise do peso corporal dos animais no início e no final do experimento. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

Marques *et al.* (2012) testaram uma suplementação concomitante de ácido linoleico, presente em *Chlorella sp.*, (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; BENÍTEZ *et al.*, 2015) e de fitosteróis e concluíram que esta associação apresentou efeitos biológicos benéficos no controle do ganho de peso e da glicemia em jejum em camundongos recebendo dieta hiperlipídica. Estes achados incentivam a continuação de pesquisas que investiguem os efeitos sinérgicos de ácido linoleico provenientes de microalgas e fitosteróis, com posterior desenvolvimento de nutracêuticos ou de alimentos funcionais.

Consumo de água e de ração

Conforme os dados da Figura 15, podemos observar que houve uma diminuição significativa no consumo de água dos animais do grupo EXP4 quando comparado com os grupos CTL3 e EXP5 no início do tratamento (1^o ao 7^o dia), mas que esta redução foi recuperada ao longo (1-30) e ao final do tratamento (21-30), aumentando significativamente este consumo em relação ao grupo CTL3. Ainda podemos notar que o grupo EXP5 apresentou na metade do tratamento (7-14), um aumento significativo no consumo de água quando comparado com o grupo CTL3, entretanto, teve uma redução significativa ao longo do tratamento (1-30) em relação ao grupo CTL3. Além do mais, o grupo EXP5 manteve a redução do consumo de água significativa no final do tratamento (21-30) quando comparado aos grupos CTL3 e EXP4.

Podemos, a partir destes resultados, constatar que o grupo EXP4 teve uma diminuição no consumo de água no início do experimento. No entanto, no final do experimento, os animais se recuperaram frente ao aumento de consumo de água, não apresentando toxicidade. Além disso, o tratamento com a dose de 1.500 mg kg^{-1} não induziu à letalidade durante os 30 dias, o que indica que, mesmo sendo tratado com uma dose bastante elevada, os animais do grupo EXP4 não apresentaram indicadores representativos de toxicidade, sendo uma dose mais segura para ser utilizado em outros possíveis estudos. Da mesma forma, os animais que receberam o extrato de microalgas na dose de 2.500 mg kg^{-1} tiveram o consumo de água diminuído, entretanto, este resultado associado ao índice de mortalidade (25%) demonstra ser uma dose com indícios de toxicidade, sendo necessário o seu uso com cautela.

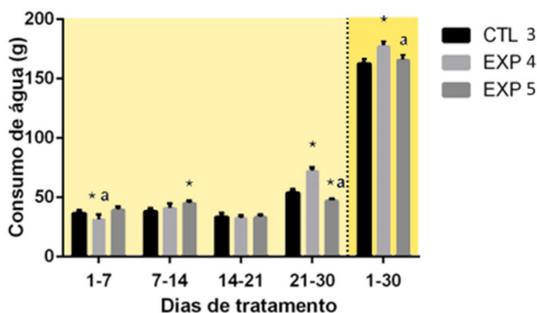


Figura 15. Consumo de água no experimento de toxicidade subcrônica. Resultados referentes a 7-8 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. *Diferença significativa em relação ao grupo CTL3; ^adiferença significativa entre os grupos EXP4 e EXP5.

A Figura 16 mostra o consumo de ração pelos diferentes grupos durante o experimento, onde podemos observar um aumento constante no decorrer do experimento no consumo do grupo EXP5 quando comparado com o grupo CTL3, em todos os períodos registrados (1-7; 7-14; 14-21; 21-30; 1-30). Já o grupo EXP4 consumiu menos ração significativamente nos períodos do 7-14 e 14-21 dias de tratamento em relação

aos grupos CTL3 e EXP5. Em contrapartida, foi visto um aumento no consumo de ração no grupo EPX4 no início (1-7), final (21-30) e ao longo do experimento (1-30) quando comparado ao grupo CTL3, o que representa uma recuperação neste consumo pelo grupo EXP4.

Estes resultados indicam que a administração subcrônica do extrato de microalgas nas doses de 1.500 e 2.500 mg kg⁻¹ promoveu maior ingestão de ração pelos animais destes grupos, resultado não esperado, já que segundo a literatura a biomassa de microalgas contém três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídios (PEREIRA *et al.*, 2012), o que serviria como suplemento e promoveria a inibição de apetite (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Maiores estudos deverão ser realizados a fim de esclarecer esses dados encontrados.

Este conjunto de resultados indica, no entanto, que as doses de 1.500 e 2.500 mg kg⁻¹ não apresentam indicativos de toxicidade para este parâmetro avaliado, pois apresentou um aumento no consumo de ração, porém devem ser utilizadas com cautela se o objetivo da pesquisa for a utilização do extrato para fins farmacológicos, por serem doses bastante elevadas, onde a dose de 2.500 mg kg⁻¹ é maior do que a prevista na literatura (VALADARES, 2007; CAZARIN *et al.*, 2004).

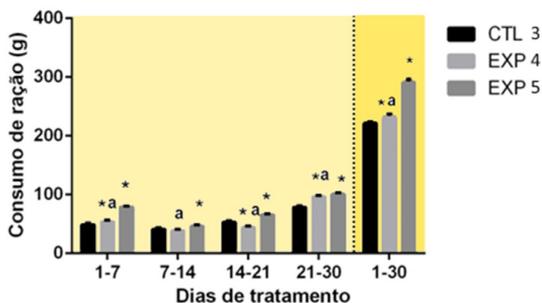


Figura 16. Consumo de ração no experimento de toxicidade subcrônica. Resultados referentes a 7-8 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. *Diferença significativa em relação ao grupo CTL3; ^adiferença significativa entre os grupos EXP4 e EXP5.

Pesos relativo e absoluto dos órgãos

Os pesos relativos e absolutos dos órgãos analisados não se mostraram estatisticamente diferentes, conforme os dados representados nas Figuras 17 e 18, respectivamente. Este resultado nos mostra ausência de toxicidade nos órgãos analisados, sendo entre estes o fígado e o rim, órgãos indispensáveis para metabolização e excreção de substâncias tóxicas presentes no organismo. O fígado metaboliza grande diversidade de substâncias, não só autógenos (sais biliares, bilirrubina, hormônios), mas também exógenos (drogas e toxinas) (MARTELLI, 2010). Já os rins exercem importante papel depurador do sangue, excretando substâncias polares e hidrossolúveis (SAMPAIO *et al.*, 2012). Alterações no tamanho dos rins podem ser de origem imunológica, inflamatória, infecciosa, neoplásica, degenerativa e outras, o que não ocorreu nos animais que foram expostos ao extrato microalgáceo. Nossos resultados encontrados mostram um equilíbrio de peso nos órgãos entre os animais dos diferentes grupos, demonstrando ausência de toxicidade nas vias metabólicas e de excreção.

De acordo com os resultados obtidos nos testes via i.p. e gavagem, os resultados corroboram com a afirmação de que a toxicidade do extrato de microalgas está mais relacionada com a via de administração do que com a dose utilizada.

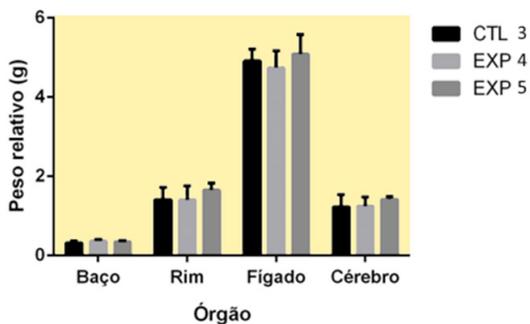


Figura 17. Peso relativo dos órgãos no experimento de toxicidade subcrônica. Resultados referentes a 7-8 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

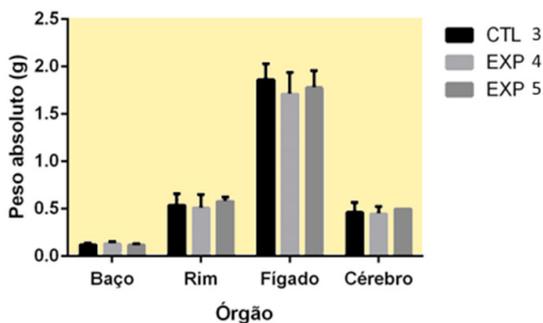


Figura 18. Peso absoluto dos órgãos no experimento de toxicidade subcrônica. Resultados referentes a 7-8 animais por grupo. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

Nos testes de toxicidade subcrônica, o período de exposição diário é prolongado e tem como objetivo observar se por um longo período de tempo o produto testado causa efeitos adversos a doses acumulativas de agente tóxico. Para estes testes, recomenda-se que a dose utilizada não deve ultrapassar 2.000 mg kg^{-1} de peso corpóreo da substância testada (BEDNARCZUK *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2012). Frente aos resultados obtidos no grupo EXP4, que recebeu o extrato de microalgas na dose de 1.500 mg kg^{-1} , quanto ao índice de mortalidade (0%) e sinais clínicos de toxicidade, apesar de haver maior intensidade de piloereção ao final do tratamento, os dados de consumo de ração, água, ganho de peso corporal e peso absoluto e relativo dos órgãos não demonstraram, de uma maneira geral, alterações de toxicidade, podendo ser considerada uma dose segura. Porém, estes parâmetros devem ser considerados se o objetivo da pesquisa for a utilização do extrato para fins farmacológicos.

Em contrapartida, os animais tratados com o extrato de microalgas na dose de 2.500 mg kg^{-1} , apesar de terem um alto consumo de ração durante todo o experimento e não haver sinais clínicos de toxicidade, apresentam um índice de mortalidade (25%), o que pode ser explicado pelo fato de que esta é uma dose elevada, que o tempo de exposição é prolongado e que o efeito é cumulativo no organismo do animal; e ressalta-se que este resultado também deve ser levado em conta se esta dose for utilizada para fins farmacológicos.

Conclusão

A biomassa resultante do processo de fitorremediação de dejetos suínos, rico em nutrientes, apresentou elevadas concentrações de proteínas e carboidratos e baixo teor de lipídios. No entanto, essa composição pode ser melhorada significativamente pelo processo operacional simples, controlando a disponibilidade de N e P. Dessa maneira, na ausência de N e P, o conteúdo de lipídios pode ser aumentado de 3 para 16%. Esse incremento no teor de lipídios pode ser particularmente rele-

vante para produção de biodiesel e bioprodutos, por exemplo (MICHELON *et al.*, 2015).

Os estudos toxicológicos apresentam como principal objetivo a predição dos possíveis efeitos adversos que podem se manifestar quando da exposição humana ou animal à determinada substância química (CAZARIN *et al.*, 2004). A administração aguda do extrato de microalgas contendo *Chlorella* e *Scenedesmus*, nas doses de 1.500 mg kg⁻¹ e 2.500 mg kg⁻¹, pela via i.p. foi considerada tóxica, enquanto que a administração aguda do extrato na dose de 2.500 mg kg⁻¹, pela via gavagem, demonstrou indícios de toxicidade. A administração subcrônica do extrato de microalgas contendo *Chlorella* e *Scenedesmus* na dose de 2.500 mg kg⁻¹, pela via gavagem durante 30 dias, foi considerada levemente tóxica em função da baixa letalidade, enquanto que a administração do extrato na dose de 1.500 mg kg⁻¹ demonstrou segurança na administração durante 30 dias de tratamento, mas que este resultado deve ser levado em conta se esta dose for utilizada para fins farmacológicos.

Agradecimentos

Este projeto foi desenvolvido com os recursos provenientes do Macroprograma 2 da Embrapa (projeto SEG n° 02.12.08.004.00.00), e foi possível pelo Convênio de Cooperação Técnica Embrapa-URI Erechim (n° 478/2016).

Referências

ADAMS, C.; BUGBEE, B. Nitrogen retention and partitioning at the initiation of lipid accumulation in nitrogen deficient algae. **Journal of Phycology**, v. 50, n. 2, p. 356-365, 2014.

AMARAL, E. A.; SILVA, R. M. G. Avaliação da toxicidade aguda de angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com artemia salina. **Revista Eletrônica da Pesquisa**, Patos de Minas, p. 1-16, 2008.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 5th ed., 2nd print. Champaign, Ill.: AOCS, c2004. 1 v.

AN, M.; MOU, S.; ZHANG, X.; ZHENG, Z.; YE, N.; WANG, D.; ZHANG, W.; MIAO, J. Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 77-83, 2013.

ARAÚJO, M. F.; NAVARRO, F. Consumo de suplementos nutricionais por alunos de uma academia de ginástica, Linhares, Espírito Santo. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 2, n. 8, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Arlington> AOAC, 1995. 2 v. Edited by Patrícia Cunniff.

AZEVEDO, F. A. de. A Toxicologia e o Futuro. **Revista de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 3, n. 3, p. 4-17, 2010.

BARROS, E.; BARROS, H. M. **Medicamentos na prática clínica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

BARROW, C.; SHAHIDI, F. (Ed.) **Marine nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2007.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. 293 p. (Cambridge studies in biotechnology; 10).

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: applied phycology and Biotechnology**. 2nd. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2013. p. 312-351.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Tests *in vitro* and *in vivo* used in the toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 11, n. 2, 2010.

BENÍTEZ, L. T.; HENAO-ARGUMEDO, D.; ALVEAR-ALAYÓN, M.; CASTILLO-SALDARRIAGA, C. R. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas. **Revista Facultad de Ingeniería**, v. 24, n. 39, p. 43-54, 2015.

BI, Z.; HE, B. B. Characterization of microalgae for the purpose of bio-fuel production. **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v. 56, n. 4, p. 1529-1539, 2013.

BOELSTERLI, U.A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **Journal Toxicological Sciences**, v. 28, n. 3, p.109-21, 2003.

BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um "mecanismo de desenvolvimento limpo". **Atlântica**, Rio Grande, v. 29, n. 1, p. 35-46, 2007.

BREUER, G.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217-226, 2012.

BRUNNER E. Oily fish and omega 3 fat supplements. **BMJ**, v. 332, n. 7544, p. 739-740, 2006.

BRUTON, T.; LYONS, H.; LERAT, Y.; STANLEY, M.; RASMUSSEN, M. B. **A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland**. Dublin: Sustainable Energy Ireland, 2009.

CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 339-347, 2010.

CARVALHO, A. P.; MONTEIRO, C. M.; MALCATA, F. X. Simultaneous effect of irradiance and temperature on biochemical composition of the microalga *Pavlova lutheri*. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, n. 5, p. 543-552, 2009.

CAZARIN, K.C.C.; CORREA, C. L. ; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CHO, K.; HUR, S. P.; LEE, C. H.; KO, K.; LEE, Y. J.; KIM, K. N.; KIM, M. S.; CHUNG, Y. H.; KIM, D.; ODA, T. Bioflocculation of the oceanic microalga *Dunaliella salina* by the bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, and its effect on biodiesel properties of the biomass. **Bioresource technology**, v. 202, p. 257-261, 2016.

CHU, F. F.; CHU, P. N.; CAI, P. J.; LI, W. W.; LAM, P. K. S.; ZENG, R. J. Phosphorus plays an important role in enhancing biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* under nitrogen deficiency. **Bioresource technology**, v. 134, p. 341-346, 2013.

CHU, F. F.; CHU, P. N.; SHEN, X. F.; LAM, P. K.; ZENG, R. J. Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. **Bioresource technology**, v.152, p. 241-246, 2014.

CHU, F. L.; PIRASTRU, L.; POPOVIC, R.; SLENO, L. Carotenogenesis Up-regulation in *Scenedesmus* sp. Using a Targeted Metabolomics Approach by Liquid Chromatography - High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 3004-3013, 2011.

COMPÊNDIO brasileiro de alimentação animal 2009. São Paulo: SINDIRAÇÕES, 2009.

CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.

CUNHA, L. C.; AZEVEDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. de S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 403-411, 2009.

DEAN, A. P.; SIGEE, D. C.; ESTRADA, B.; PITTMAN, J. K. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4499-4507, 2010.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.

DHARGALKAR, V. K.; VERLECAR, X. N. Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, n. 3, p. 229-242, 2009.

DUARTE, D. R. S. **Alimentos funcionais com microalgas**: nova fonte de pigmentos, antioxidantes e ácidos gordos ómega 3. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

ÉVORA, P. R. B.; REIS, C. L; FERREZ, M. A.; CONTE, D. A.; GARCIA, L. V. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio acidobásico-uma revisão prática. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 4, p. 451-469, 1999.

FERNANDES, B. D.; DRAGONE, G. M; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Light regime characterization in an airlift photobioreactor for production of microalgae with high starch content. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 218-226, 2010.

FERNÁNDEZ, D. R.; CHICA, C.; ROVIRA, M. S. Obtención de ácidos grasos a partir de biomasa microalgal cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación. **Revista Elementos**, n. 3, 2013.

FERREIRA, L. K. D. P. **Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda e genotoxicidade do alcaloide sintético MHTP [1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-7-metoxi-1, 2, 3, 4,-tetrahidroisoquinolina]**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

FERREIRA, S. P.; SOUZA-SOARES, L. de; COSTA, J. A. V. Review: microalgae: an alternative source to obtain essential fatty acids, **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 275-287, 2013.

GALINDRO, B. M. **Análise técnica e avaliação do ciclo de vida de culturas de produção de microalgas para biodiesel**. 2012. 92 f. Mestrado (Pós-graduação em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GAO, C.; ZHAI, Y.; DING, Y.; WU, Q. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, v. 87, n. 3, p. 756-761, 2010.

GEORGE, B.; PANCHAL, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – a potential strain for bio-fuel production. **Bioresource technology**, v. 171, p. 367-374, 2014.

GÜÇLÜ, Z.; ERTAN, Ö. O. Toxicity and removal of zinc in the three species (*acutodesmus obliquus*, *desmodesmus subspicatus* and *desmodesmus armatus*) belonging to the family, *scenedesmaceae* (chlorophyta). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 12, p. 309-314, 2012.

GUERRA, M. de O.; OLIVEIRA, L. E. G. de; PETERS, V. M. Pre-embryo development in rats treated with oxcarbazepine in the first four days after insemination. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 4, p. 346-353, 2000.

GUIMARÃES JÚNIOR, C. L. P.; GUIMARÃES, R. S.; OLIVEIRA, R. S. Estudo Ecotoxicológico em Microalgas na Lagoa de Araruama, Rio de Janeiro, Brasil. In: CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 5. Campos dos Goytacazes, 2013. **A Ciência pela Água**. CONFICT, 2013.

GUO, F.; WANG, H.; WANG, J.; ZHOU, W.; GAO, L.; CHEN, L.; DONG, Q.; ZHANG, W.; LIU T. Special biochemical responses to nitrogen deprivation of filamentous oleaginous microalgae *Tribonema* sp. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 19-24, 2014.

HERNANDEZ, A. J.; NAHAS, R. M. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, p. 3-12, 2009.

HO, S.; CHEN, C.Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244-252, 2013.

HORROCKS, L. A.; YEO, Y. K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacology Research**, v. 40, n. 3, p. 211-225, 1999.

HU, H.; GAO, K. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 13, p. 987-992, 2006.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 8, p. 631-635, 2000.

JIAN-MING, L. V.; CHENG, L. H.; XU, X. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6797-6804, 2010.

KHALIL, Z. I.; ASKER, M. M.; EL-SAYED, S.; KOBBI, I. A. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1225-1231, 2010.

KRZEMIŃSKA, I.; PIASECKA, A.; NOSALEWICZ, A.; SIMIONATO, D.; WAWRZYKOWSKI, J. Alterations of the lipid content and fatty acid profile of *Chlorella protothecoides* under different light intensities. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 72-77, 2015.

LEE, J. Y.; YOO, C.; JUN, S. Y.; AHN, C. Y.; OH, H. M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. S75-S77, 2010.

LIANG, S.; XUEMING, L.; CHEN, P.; CHEN, Z. Current microalgal health food R&D activities in China. **Hidrobiologia**, v. 512, n. 1, pp. 45-48, 2004.

LIMA, C. M. P.; SOARES, R. P. F.; BASTOS, I. V. G. A.; GRANGEIRO, A. R. S.; GURGEL, A. P. A. D.; SILVA, A. C. P.; SILVA, J. G.; OLIVEIRA, R. A. G.; SOUZA, I. A. Avaliação da toxicidade aguda do extrato das cascas de *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Paulínia, v. 16, n. 4, p. 832-838, 2014b.

LIMA, E. F.; MAIA, L. A.; NASCIMENTO, E. M. de; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F. Infecção disseminada por *Chlorella* sp. em um ovino. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, p.1253-1256, 2014a.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa. 2006.

LU, Y.; ZHAI, Y.; LIU, M.; WU, Q. Biodiesel production from algal oil using cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as feedstock. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 5, p. 573-578, 2010.

MAIA, L. A.; LIMA, E. F.; NASCIMENTO, E. M.; DANTAS, A. F.; RIET-CORREA, F. M. Hepatite por *Chlorella* sp. em um ovino no semiárido da Paraíba. In: III Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária – ENAPA-VE, Fórum de Lâminas, 2015.

MALONE M. H.; ROBICHAUD R. C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 127-147, 1983.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320-332, 1962.

MARQUES, A. C.; DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Redução do peso e da glicemia resultante da suplementação de ácido linoleico conjugado e fitosteróis à dieta hiperlipídica de camundongos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 2, p. 374-380, 2012.

MARTELLI, A. Metabolismo Hepatocelular dos Lipídeos: uma Abordagem Clínica e Histopatológica do Acúmulo Intracelular de Lípidos (Esteatose) do Parênquima Hepático Induzida pelo Álcool. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 12, n. 1, p. 55-59, 2010.

MARTÍNEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; EL YOUSFI, F.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 263-272, 2000.

MARTINS, V. G. **Avaliação da toxicidade de substâncias antivirais derivadas de algas marinhas e substâncias sintéticas em camundongos Balb/c**. 2009. Dissertação – (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Niterói.

MASIMIREMBWA, C. M.; BREDBERG, U.; ANDERSSON, T. B. Metabolic stability for drug discovery and development. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 6, p. 515-528, 2003.

MATOS, A. P.; MORIOKA, L. R. I.; SANT'ANNA, E. S.; FRANÇA, K. B. Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp. cultivada em concentração de dessalinização residual. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 2, p. 364-370, 2015.

METTING JÚNIOR, F. B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, n. 5-6, p. 477-489, 1996.

MICHELON, W. **Ficorremediação de efluentes da suinocultura: efeitos da composição do substrato e dos nutrientes (N e P) na composição química das microalgas**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MICHELON, W.; SILVA, M. L. DA; MEZZARI, M. P.; PIROLI, M.; PRANDINI, J. M.; SOARES, H. M. Effects of nitrogen and phosphorus on biochemical composition of microalgae polyculture harvested from phycoremediation of piggery wastewater digestate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 1407-1419, 2016.

MILLEDGE, J. J. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 31-41, 2011.

MIMOUNI, V.; ULMANN, L.; PASQUET, V.; MATHIEU, M.; PICOT, L.; BOUGARAN, G.; CADORET, J. P.; MORANT-MANCEAU, A.; SCHOEFS, B. The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 15, p. 2733-2750, 2012.

MORIOKA, L. R. I.; MATOS, A. P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E. S. Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 44-49, 2014.

MOURA, N. S.; VASCONCELOS, A.C. M.; BERNABÉ, B. M. ; TEIXEIRA, L. J. Q. ; SARAIVA, S. H. Ensaio toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 1946, 2012.

MSANNE, J.; XU, D.; KONDA, A. R.; CASAS-MOLLANO, J. A.; AWADA, T.; CAHOON, E. B.; CERUTTI, H. Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. **Phytochemistry**, v. 75, p. 50-59, 2012.

MUKINDA, J. T.; EAGLES, P. F. K. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 236-240, 2010.

NOGUEIRA, D. P. K.; SILVA, A. F.; ARAÚJO, O. Q.; CHALOUB, R. M. Impact of temperature and light intensity on triacylglycerol accumulation in marine microalgae. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 208-287, 2015.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 474 p.

OLIVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, R. A., SILVA, F. S.; REIS, S. A. G. B.; RIBEIRO, L. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

OLIVEIRA, M. A. C. L. DE; MONTEIRO, M. P. C.; ROBBS, P. G.; LEITE, S. G. F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquaculture International**, v. 7, n. 4, p. 261-275, 1999.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity – fixed dose procedure**. Paris: OECD, 2001.

PABST, W.; PAYER, H. D.; ROLLE, I.; SOEDER, C. J. Multigeneration feeding studies in mice for safety evaluation of the microalga, *Scenedesmus acutus*. I. Biological and haematological data. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 249-254, 1976.

PACHECO, R.; FERREIRA, A. F.; PINTO, T.; NOBRE, B. P.; LOUREIRO, D.; MOURA P.; GOUVEIA, L.; SILVA C. M. The production of pigments & hydrogen through a *Spirogyra* sp. biorefinery. **Energy Conversion and Management**, v. 89, n. 1, p. 789-797, 2015.

PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; FERREIRA, S. P.; COSTA, J. A. V. Hidrolisados de *Chlorella pyrenoidosa*: Avaliação da Solubilidade Proteica. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 4., 2012. Bagé. **Compartilhe saberes, vivencie experiências e almeje sustentabilidade**: anais. Bagé: Unipampa, 2012. v. 4, n. 2. SIEPE.

PIMENTEL, L. C. F.; CHAVES, C. R.; FREIRE, L. A. A.; AFONSO, J. C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p.1138-1149, 2006.

QUEVEDO O. C.; MORALES, S.; ACOSTA, A. Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. **Vitae**, v. 15, n. 1, p. 25-31, 2008.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas com gases de combustão formados da geração termelétrica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

RAMOS, A. F. L. H.; RODRIGUES, J. K.; SILVA, L. R. da; GUERRA, M. de O; PETERS, V. M. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com tracrólímus durante a fase pré-implantação. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 5, p. 219-23, 2008.

RAMOS, D. F.; MATTHIENSEN, A.; COLVARA, W.; VOTTO, A. P. S. de; TRINDADE, G. S.; SILVA, P. E. A. de; YUNES, J. S. Antimycobacterial and cytotoxicity activity of microcystins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 9, 2015.

RANG, H. P.; RITTER, J.M.; DALE, M. Maureen. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.

RENAUD, S. M; THINH, L.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, v. 211, n. 1, p. 195-214, 2002.

RICE, E. W.; BAIRD, R. B.; EATON, A. D.; CLESCERI, L. S. (Ed.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2012.

ROLEDA, M. Y.; SLOCOMBE, S. P.; LEAKEY, R. J.; DAY, J. G.; BELL, E. M.; STANLEY, M. S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 439-449, 2013.

ROOPNARAIN, A.; GRAY, V. M.; SYM, S. D. Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 408-411, 2014.

RUANGSOMBOON, S.; GANMANEE, M.; CHOOCHOTE, S. Effects of different nitrogen, phosphorus, and iron concentrations and salinity on lipid production in newly isolated strain of the tropical green microalga, *Scenedesmus dimorphus* KMITL. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 867-874, 2013.

SAFI, C.; CHARTON, M.; PIGNOLET, O.; PONTALIER, P. Y. VACA-GARCIA, C. Evaluation of the protein quality of *Porphyridium cruentum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 2, p. 497-501, 2013.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P. Y. VACA-GARCIA, C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, 2014.

SAMPAIO, J.; TREMÉA, R.; DE MARCO, M. G.; VIEIRA, R. B.; TACCA, J. A.; STRÖHER, D. J.; PILAR, B. C.; GÜLLICH, A. A. C.; SCHWANZ, M.; MANFREDINI, V. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguayensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 4, p. 462-467, 2012.

SCHINONI, M. I. Fisiologia hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 140 n. 2, p. 5-9, 2006.

SIAUT, M.; CUIÑÉ, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; LI-BEISSON Y.; PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, v. 11 n. 1, p. 7, 2011.

SIJTSMA, L.; SWAAF, M. E de. Biotechnological production and applications of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 64, n.2, p.146–153, 2004.

SILVA, E. C. B. **Avaliação biológica da *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae-Caesalpinioidea: usos e riscos**, 137 p. 2006. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, J. E. S.; MOURA, A. M. A.; NOGUEIRA, R. A. Efeito dos ácidos graxos essenciais sobre lipidemia e vascularização da membrana vitelina de codornas japonesas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p.1603-1612, 2012.

SILVA, S. L. da; NASCIMENTO, A. A. do; RIBEIRO, E. F. B.; RIBEIRO, R. B.; ALVES, C. M.; SANTOS, A. M. dos; BURMANN, A. P. R.; MIRANETO, R. de A. Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

SINGH, B.; GULDHE, A.; RAWAT, I.; BUX F. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 29, p. 216-245, 2014.

SOEDER, C. J.; HEGEWALD, E. *Scenedesmus*. In: BOROWITZKA M. A.; BOROWITZKA L. J. **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 59-84.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, n. 1, p. 217-224, 2005.

SPOLAOREA, P.; JOANNIS-CASSANA, C.; DURANB, E.; ISAMBERTA, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STEVENS K. R.; MYLECRAINE L. Issues in chronic toxicology. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 3 ed. New York: Raven Press, 1994.

SUN, X.; CAO, Y.; XU, H.; LIU, Y.; SUN, J.; QIAO, D.; CAO, Y. Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 204-212, 2014.

TALEBI, A. F.; MOHTASHAMI, S.K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; HADAVAND MIRZAEI, H.; MIRZAJANZADEH, M.; MALEKZADEH SHAFAROUZI, S.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: a selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258-267, 2013.

TARALDSVIK, M.; MYKLESTAD, S. M. The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **European Journal of Phycology**, v. 35, n. 2, p. 189-194, 2000.

TEIXEIRA, C.; SILVA, E.; CRUZ, M.; NAVARRO, A. C. A eficácia da *Chlorella* como inibidor de apetite associada ao exercício físico e dieta balanceada alterando a composição corporal. Revista Brasileira de Obesidade, **Nutrição e Emagrecimento**, v. 2, n. 11, p. 423-433, 2008.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V.. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d, l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

TURINI, C. A. **Fundamentos de toxicologia**. Curso de Toxicologia, ANVISA, [2012]. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/89230091/Fundamentos-de-Toxicologia>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, 2007.

VECINA, J. F.; OLIVEIRA, A. G.; ARAUJO, T. G.; BAGGIO, S. R.; TORRELO, C. O.; SAAD, M. J.; QUEIROZ, M. L. *Chlorella* modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice. **Life Sciences**, v. 95, n. 1, p. 45-52, 2014.

VENKATARAMAN, L. V.; BECKER, W. E.; KHANUM, P. M.; MATHEW, K. R. Short term feeding of alga *Scenedesmus acutus* processed by different method growth pattern and histo pathological studies. **Nutrition Reports International**, v. 16, n. 3, p. 231-240, 1977.

VENKATARAMAN, L. V.; BECKER, W. E.; RAJASEKARAN, T.; MATHEW, K. R. Investigations on the toxicology and safety of algal diets in albino rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 271-275, 1980.

WAHIDIN, S., IDRIS, A.; SHALEH, S. R. M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. **Bioresource technology**, v. 129, p. 7-11, 2013.

WUA, H.; MIAO, X. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 421-427, 2014.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 6, p. 487-502, 1996.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1000 p.

ZHANG, W.; ZHANG, P.; SUN, H.; CHEN, M.; LU, S.; LI, P. Effects of various organic carbon sources on the growth and biochemical composition of *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 52-58, 2014.

ZHU, S.; HUANG, W.; WANG, Z.; XU, J.; YUAN, Z. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 292-298, 2014.

Embrapa

Suínos e Aves

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

