

Ciência de alimentos

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO MICROENCAPSULADO DE *SPIRULINA PLATENSIS* SOBRE AS CÉLULAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Marina Migliavacca*, Tatiana Oro, Mariana da Silva Formigheri, Jorge Alberto Vieira Costa, Telma Elita Bertolin

Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS

*E-mail: marinami08@hotmail.com

RESUMO A microencapsulação consiste em formar pequenas partículas são embaladas em materiais específicos, formando partículas com diâmetro entre 1 e 1000 µm. O material protetor forma uma matriz que protege compostos sensíveis contra ambientes adversos e pode controlar sua liberação. Os materiais microencapsulantes são selecionados em função das propriedades do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas. A perspectiva de inovação da indústria de alimentos para o século XXI sugere a pesquisa de novas substâncias e compostos provenientes de diferentes fontes naturais, como plantas, fungos e algas marinhas. A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria rica em compostos antioxidantes instáveis, e por isso, necessitam ser protegidos para que possam ser absorvidos pelo organismo humano e também apresentar maior aplicação industrial. Objetivou-se avaliar a atividade antioxidante do extrato microencapsulado da *Spirulina platensis*, em células de *Saccharomyces cerevisiae*. O extrato da *Spirulina platensis* foi microencapsulado com goma arábica. Estes microencapsulados foram submetidos a testes antioxidantes *in vitro* e *in vivo* em células de *Saccharomyces cerevisiae*, verificando assim, que a técnica de microencapsulação do extrato úmido promoveu a eficiente proteção da atividade antioxidante do extrato quando comparada ao não microencapsulado.

Palavras-chave: encapsulação, atomização, pigmento

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a saúde e almejam o consumo de alimentos saudáveis, desta forma, o consumo desses, pode atenuar o estresse oxidativo (BERTOLIN et al., 2011). A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria, rica em proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas, sais minerais e compostos que atuam como antioxidantes. Devido à sua composição química, apresenta grande potencial nutricional, podendo ser comercializada como suplemento alimentar. A ação antioxidante da *Spirulina platensis* deve-se aos compostos antioxidantes presentes no extrato aquoso da microalga, porém estes compostos são instáveis, podendo perder sua função se não protegidos a ambientes adversos. Desta forma, técnicas, como a

microencapsulação podem proteger estes compostos de fatores como umidade, pH, calor, oxigênio e luz, melhorando sua estabilidade e mantendo a viabilidade do material encapsulado. A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, representa um dos mais importantes modelos experimentais usados em pesquisas para avaliar stress oxidativo, devido ao fácil cultivo, além de curto tempo de geração quando comparado com as células animais (DENG; CHOW, 2011). Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar a microencapsulação do extrato aquoso de *Spirulina platensis* e avaliar a sua atividade antioxidante *in vitro* e no modelo experimental *Saccharomyces cerevisiae*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O extrato aquoso da *S.platensis* LEB 18, foi obtido através de 1 g da microalga juntamente com 30 ml de água destilada, após seis ciclos de 3 horas, de sucessivos congelamentos e descongelamentos. Após, as alíquotas foram centrifugadas por 15 min a 6000 rpm, obtendo-se o sobrenadante, sendo este o extrato aquoso da microalga (SILVEIRA et al., 2005). Para a microencapsulação, goma arábica foi dissolvida em água (30% p/v), utilizando agitação magnética e temperatura de 40 °C. Após, em agitador mecânico, durante 30 min a 2500 rpm, e utilizando a proporção 1:3 de extrato/encapsulante, em relação ao teor de sólidos totais, misturou-se por gotejamento o extrato aquoso da microalga na solução encapsulante, e depois submetido a agitação durante 4 min em agitador tipo Turrax. O extrato microencapsulado foi dividido em duas frações, o que não foi submetido à secagem, denominado extrato microencapsulado úmido (GA+ Ext. Úmido), e o outro, submetido à secagem em *Spray Dryer* (GA+ Ext. Seco), com temperatura do ar de entrada a 150 °C e temperatura de saída 90 °C. Após, as amostras foram armazenadas em ultra-freezer a -80 °C até o momento das análises.

A análise morfológica externa das cápsulas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura. Foi realizada a dosagem de proteínas com o objetivo de comprovar a presença de proteínas do extrato nas microcápsulas, seguindo o protocolo de Lowry et al., (1951). Para a análise da estabilidade das microcápsulas, foi avaliada a medida da capacidade antioxidante, pelo método DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrozil), de acordo com Brand-Williams; Cuvelier; Berset, (1995), adaptado por Mensor et al., (2001) e Xiong et al., (1996), na qual foi preparada uma solução 0,1 mM de DPPH, pesando 0,03943 g e dissolvendo em 10 mL de etanol absoluto, para realizar a diluição 1:100 em etanol a 80%. Pipetou-se 2,9 mL do radical, nos tubos, e em seguida, foi medida a absorvância em 515 nm (A_0). Aos tubos foram adicionados 0,1 mL de amostra (extrato), deixadas em repouso por 30 min, e realizou-se a leitura da absorvância em 515 nm (A_f). O cálculo foi realizado através da % Inibição: $(1-A_f/A_0)*100$, em que: A_f : Absorvância final, A_0 : Absorvância inicial, Branco: etanol 80 %.

Para a atividade em modelo *S. cerevisiae*, foi utilizada a Cepa BY 4741 obtida da *Euroscarf*. A avaliação do crescimento celular foi determinada em espectrofotômetro através da medida da absorvância a 570 nm de uma suspensão de células convertida em concentração de células (0,3 mg de peso seco de células/mL). O fator de conversão em peso seco foi calculado a partir da filtração de um volume adequado da suspensão de células em filtro Millipore (0,45 μ m), que, após, foi seco em estufa a 60 °C até atingir o peso constante e a construção de uma curva de calibração. Após o crescimento, as células foram centrifugadas e submetidas ao tratamento com agente estressor, onde foram adicionados 2,5 mL de sulfato ferroso 4,0 mM e 7,5 mL de água

estéril nos erlenmeyers contendo as leveduras, e após incubadas por 1 hora, a 90 rpm. Posteriormente, foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com 5,0 mL de água destilada estéril e armazenadas em ultra freezer (SIQUEIRA, 2006). Foram realizados os tratamentos, através de incubação (30°C) com agitação orbital a 90 rpm, no extrato aquoso *S. platensis* puro, GA+ Ext. Úmido e no GA+ Ext. Seco, nestes dois últimos tratamentos, foram realizados a dosagem de proteínas para que todos os tratamentos recebessem a mesma dosagem de extrato. Após 1 hora, com concentração de 0,8 µL de proteínas por mL de solução, foram feitas 2 lavagens com 5 mL de água destilada estéril e as células foram centrifugadas por 5 min, a 1500 rpm (BENETTI, 2013).

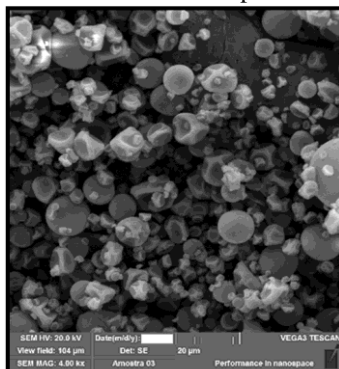
Para avaliação da peroxidação lipídica pelo método de TBARS, foi utilizado 30 mg de células, onde essas foram resuspensas em 500 µL de ácido tricloro acético 10% (TCA), e após foram adicionadas 1,5 g de pérolas de vidro, para lise celular, sob agitação de 6 ciclos de 20 s no vórtex e 6 ciclos 20 s no gelo. O extrato foi recolhido e centrifugado a 4000 rpm por um período de 4 min, onde o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises. A mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 min, e após resfriamento, foi medida a absorbância por espectrofotometria a 532 nm, sendo que o cálculo da concentração foi realizado por meio de uma curva padrão de tetrametoxipropano, e os resultados expressos em nmol MDA/mL de células (STEELS et al., 1994). Para a atividade enzimática da enzima catalase (CAT), após a lise celular o sobrenadante foi coletado e as leituras foram realizadas com a adição de 1910 µL de tampão fosfato de potássio (TFK) 50 mM pH 7,0, adicionados 20 µL da amostra diluída e 70 µL de peróxido de hidrogênio nos tempos 0s (inicial) e 15s (final), onde foi utilizado TFK como branco (NELSON; KIESOW, 1972). Para realização do cálculo, foi utilizada a curva padrão da dosagem de proteínas, e a concentração final foi dada em nmol de enzima/mL proteína.

A significância dos dados foi testada pela análise de variância (Anova) a 0,05 de probabilidade de erro e, nos modelos significativos, as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey a 95% de intervalo de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

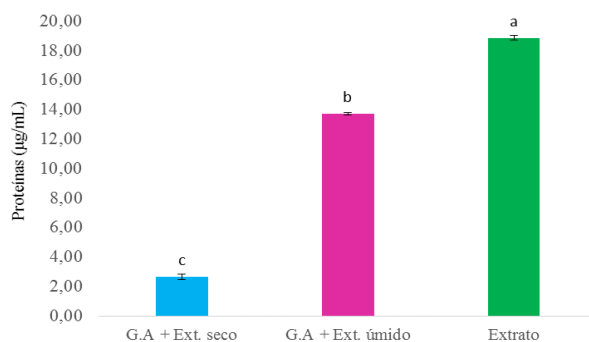
De acordo com resultados obtidos através de análise morfológica em microscópio eletrônico de varredura (MEV), verificou-se que o encapsulamento foi eficiente formando microcápsulas íntegras, sem rachaduras, com tamanhos médios entre 20 e 100 µM e que se apresentaram de forma arredondada ou levemente abauladas, que pode ser atribuído à ação do calor no processo de secagem, demonstrando que o Spray dryer pode ser utilizado para o encapsulamento do pigmento, sem causar prejuízos na morfologia das cápsulas.

Figura 1 – Análise morfológica do extrato microencapsulado em goma arábica e seco em *Spray dryer*.



Além da análise de microestrutura, em MEV, para certificar-se de que o extrato foi realmente incluso nas microcápsulas, utilizou-se a dosagem do teor de proteínas, e de acordo com a Figura 2, onde foi avaliada a concentração de proteínas nas microcápsulas secas e elaboradas com goma arábica, notou-se a presença de proteínas no interior das mesmas, o que comprovou que o extrato foi realmente microencapsulado.

Figura 2 – Dosagem de Proteína

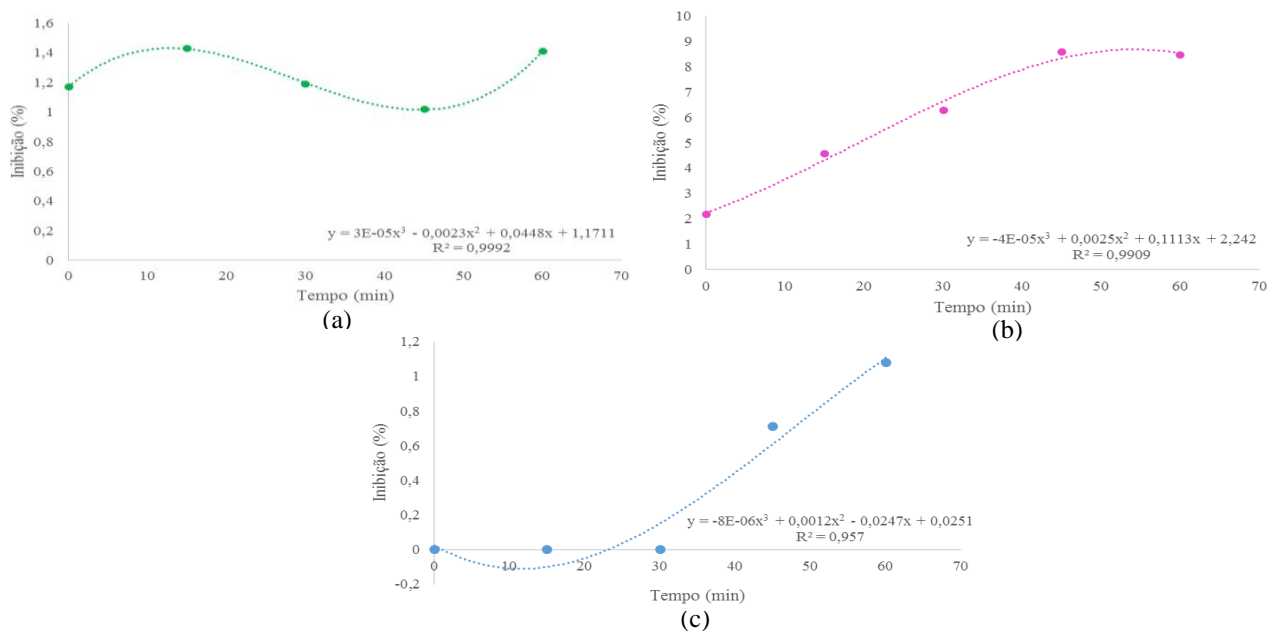


Fonte: Autor (2015)

Conforme figura acima, quando se observa a concentração de proteínas no extrato microencapsulado seco em *Spray Dryer*, percebe-se um teor inferior quando comparado ao extrato microencapsulado úmido e ao extrato puro, o que pode ser explicado pelo excesso de goma arábica, o que dificulta a análise de frações equivalentes. Com a comprovação de que o extrato foi encapsulado de forma eficiente, avaliou-se se o material microencapsulado mantinha suas propriedades antioxidantes.

A Figuras 3 mostra a capacidade antioxidante do extrato puro em relação aos microencapsulados com goma arábica, submetidos a secagem ou não, através do sequestro do radical DPPH.

Figura 3 - Capacidade antioxidante do extrato aquoso de *S. platensis* (a), do extrato aquoso de *S. platensis* microencapsulado úmido (b) e do extrato aquoso de *S. platensis* microencapsulado seco pelo método DPPH.

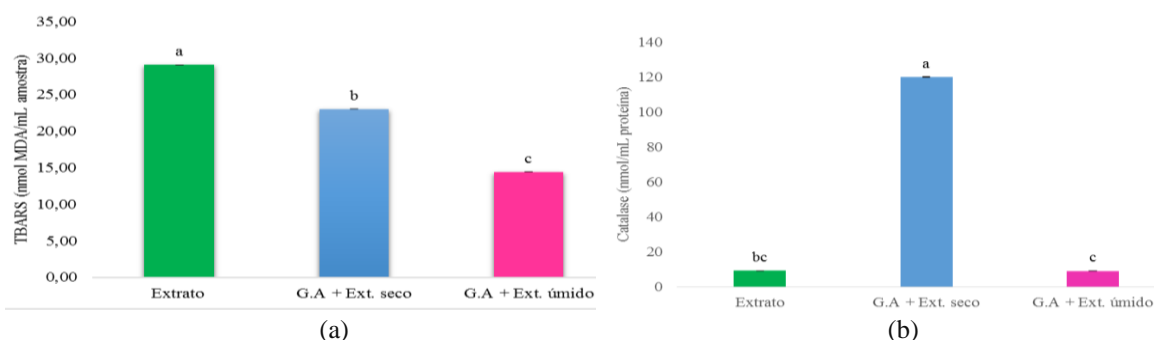


A microencapsulação foi eficiente em proteger o extrato seco e úmido. O extrato puro e o extrato microencapsulado seco apresentam percentuais de inibição muito semelhantes, porém, com picos máximos de inibição nos tempos de 15 min para o extrato puro (1,43%) e de 60 minutos extrato microencapsulado seco (1,08%). O extrato microencapsulado úmido mostrou eficiência superior em proteger o extrato das agressões do meio ambiente, com pico máximo de inibição no tempo de 60 min. Este processo permitiu que o extrato fosse protegido por tempo maior, o que sugere a possível aplicação em alimentos e suplementos alimentares.

Frente aos resultados obtidos *in vitro*, foram realizados testes para avaliar atividade antioxidante *in vivo*, com o modelo experimental a levedura *S. cerevisiae*.

A análise da peroxidação lipídica pelo método TBARS foi utilizada para testar a eficiência das microcápsulas elaboradas em proteger as células frente a peroxidação lipídica, conforme resultados obtidos e demonstrados na Figura 4 (a).

Figura 4 – Peroxidação lipídica pelo método de TBARS (a); Atividade da catalase (b)



Fonte: Autor (2015)

A Figura 4 (a) demonstra que o extrato microencapsulado úmido apresentou-se mais eficiente comparado ao extrato puro e ao extrato microencapsulado seco, comprovando o que foi observado nos testes *in vitro*. De acordo com o teste de TBAR'S, os dois tratamentos que utilizaram o processo de microencapsulação protegeram as células de *Saccharomyces cerevisiae* contra ao estresse oxidativo. Provavelmente, os extratos microencapsulados tenham apresentado maior eficiência devido ao tempo necessário para que fossem liberados da microcápsula, o que possibilitou que os radicais livres formados fossem gradativamente neutralizados.

A catalase, enzima intracelular encontrada na maioria dos organismos decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), esta decomposição pode ser acompanhada pelo decréscimo da absorbância em 240 nm, onde a diferença da absorbância por unidade de tempo é usada para medir a atividade da enzima.

De acordo com a figura 4 (b), não houve diferença significativa na atividade da catalase entre as amostras extrato puro e extrato microencapsulado úmido. O extrato microencapsulado seco promoveu aumento significativo da atividade enzimática da CAT. Verificou-se que o melhor índice de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi ocorreu de forma significativa para o extrato microencapsulado seco.

A análise da catalase responde de forma diferente aos fatores promotores de estresse oxidativo, quando comparada com a peroxidação lipídica, avaliada pelo TBAR'S. A sua atividade enzimática atua na decomposição do H_2O_2 , prevenindo a formação de espécies reativas, como os peróxidos (RISTOW; SCHMEISSER, 2011). Neste caso, o extrato seco parece ter atuado no aumento da atividade da enzima, fazendo

com que ela fosse capaz de degradar maior quantidade de moléculas de H₂O₂ por unidade de tempo, diferentemente do que ocorreu na análise de TBAR'S, em que o resultado obtido é dependente da doação de elétrons das moléculas antioxidantes do extrato para estabilizar os peróxidos que são formados pela ação do agente estressor.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, concluiu-se que a microencapsulação é um processo eficiente para proteger o extrato aquoso de *S. platensis*. Nas avaliações *in vitro*, o extrato microencapsulado úmido apresentou-se como melhor escolha, pois apresenta maiores tempos de preservação da atividade antioxidante e melhor inibição da oxidação. Tanto o microencapsulamento úmido quanto o seco são opções eficientes para proteger compostos do extrato de *S. platensis* contra a peroxidação lipídica. O extrato de *S. platensis* microencapsulado seco promove aumento significativo da atividade enzimática da enzima catalase, apresentando-se como possível ativador dos sistemas antioxidantes celulares. O processo e as condições ideais de secagem do extrato na forma microencapsulada ainda necessitam de estudos complementares, sendo que os resultados deste trabalho encorajam estudos posteriores com a inclusão do extrato microencapsulado de *S. platensis* em alimentos e suplementos alimentares.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- BENETTI, F. Restrição calórica e extrato de *Spirulina platensis* frente ao íon ferroso no envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae* deletada ao gene sir2. 2013. 232f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2013.
- BERTOLIN, T. E.; GUARIENTI Cíntia; FARIAS, D.; SOUZA, F.T.; GUTKOSKI, L.C.; COLLA, L.M. Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. *Ciênc. agrotec*, v. 35, n. 4, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, A. E.; BERSET C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.-Wiss Technol.* v. 28, p. 25 - 30, 1995.
- DENG, R.; CHOW, T. J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalga *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, v. 28, p. 33-45, 2010.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. E RANDALL R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265, 1951.
- RISTOW, M. e SCHMEISSER, S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 51, n. 2, p. 327-336, 2011.
- SIQUEIRA, E. M. A.; ALMEIDA, S. G.; ARRUDA, S. Papel adverso do ferro no organismo/ The adverse role of iron in the organismo. *Comunicação Ciência e Saúde*, v.17. n. 3, p.229-236, 2006.
- STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, v. 140, 569-576, 1994.