



IX SIMPÓSIO SUL DE GESTÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL

**XXV SEMANA ALTO URUGUAI DO MEIO AMBIENTE
ENCONTRO DO COLETIVO EDUCADOR DO ALTO URUGUAI GAÚCHO**

"Ações para a conservação da Biodiversidade"

DE 10 A 13 DE AGOSTO DE 2016

Anais

**IX Simpósio Sul de Gestão e
Conservação Ambiental**

**XXV Semana Alto Uruguai do Meio
Ambiente**

10 a 13 de Agosto de 2016





IX Simpósio Sul de Gestão e Conservação Ambiental

XXV Semana Alto Uruguai do Meio Ambiente

O conteúdo dos textos é de responsabilidade exclusiva dos (as) autores (as).
Permitida a reprodução, desde que citada a fonte

S612a Simpósio Sul de Gestão e Conservação Ambiental (9. : 2016 : Erechim, RS)
Anais [recurso eletrônico] : / Simpósio Sul de Gestão e Conservação
Ambiental. - Erechim, 2016.

ISBN: 978-85-7892-106-4

Modo de acesso:

<http://www.uricer.edu.br/site/informacao.php?menu_superior_adicional=18>
Editora EdiFAPES (acesso em: 01 set. 2016).

Evento realizado na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das
Missões – Campus de Erechim.
Com Anais / XXV Semana Alto Uruguai do Meio Ambiente (SAUMA) -
Encontro Coletivo Educador do Alto Uruguai Gaúcho.

“Organização: Luiz Ubiratan Hepp, Vanderlei Secreti Decian”

1. Biodiversidade 2. Educação ambiental 3. Tecnologias ambientais 4. Ecologia
5. Gestão ambiental I.Título

CDU: 504.06 (063)

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278



EDIFAPES

Livraria e Editora

Av. Sete de Setembro, 1621

99.709-910– Erechim-RS

Fone: (54) 3520-9000

www.uricer.edu.br



AValiação DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA DO EXTRATO DE MICROALGAS EM CAMUNDONGOS

Julia Livia Nonnenmacher¹; Mayara Breda¹; Alexandre Matthiensen³; Willian Michelon⁴;
Helissara Silveira Diefenthaeler¹; Ana Cristina Roginski¹; Fernanda Dal Maso Camera¹;
Silvane Souza Roman¹

¹URI – Erechim, Av. Sete de Setembro 1621, CEP 99709-910, Erechim – RS, Brasil ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Suínos e Aves, Rod. BR153 s/nº, CEP 89700-991, Concórdia – SC, Brasil.

⁴Universidade do Contestado – Campus Concórdia, Rua Victor Sopesla 3000, Bairro Salete, CEP 89700-000, Concórdia – SC, Brasil - julia_nonnenmacher@outlook.com

INTRODUÇÃO

O cultivo microalgal é um dos mais promissores processos biotecnológicos em desenvolvimento (RADMANN, 2007). O progressivo interesse no estudo da biomassa derivada destes microrganismos é devido à sua utilização comercial em diferentes áreas, na produção de biocombustíveis, cosméticos, nutrição humana e animal, tratamento de águas residuais (CHO et al., 2016), na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química, farmacêutica, nutracêutica, dentre outras (DERNER et al., 2006).

Uma espécie comumente usada na biotecnologia em culturas para a produção de biomassa para ração animal e suplemento alimentar é a *Scenedesmus* sp. (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, 2008). A *Chlorella* sp. é uma microalga unicelular microscópica, encontrada em tanques e lagos, rica em clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais (RADMANN, 2007). É uma das espécies vendidas como suplemento alimentar (PEREIRA et al., 2012) a qual apresenta diversos benefícios na saúde como a eficácia em úlceras gástricas, fermentos e constipação, juntamente com a ação preventiva contra a aterosclerose, hipercolesterolemia e atividade antitumoral (BECKER, 1994).

No entanto, mais estudos nutricionais e toxicológicos são necessários antes de as microalgas cultivadas poderem ser utilizadas de forma segura para a alimentação animal, ou como aditivos na dieta e saúde humana (DERNER et al., 2006; BONOTTO, 1988), pois além de produzir uma gama de moléculas bioativas com propriedades farmacológicas, as microalgas podem produzir toxinas (DERNER et al., 2006), as quais podem provocar reações adversas ou até causar algum tipo de intoxicação durante o seu uso.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial toxicológico do extrato de microalgas contendo as espécies *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. durante 30 dias de tratamento em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

As microalgas utilizadas para a obtenção do extrato foram obtidas de uma lagoa facultativa empregada como processo de tratamento terciário, localizada na EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia, SC). O cultivo foi realizado em escala piloto em uma casa de vegetação sob luz natural ($90-733 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ambiente ($15,4-48 \text{ }^\circ\text{C}$). Após 7 dias, a biomassa foi separada por centrifugação. As células foram ressuspensas em água livre de nutrientes e, após 25 dias de privação nutricional, a biomassa foi novamente centrifugada e liofilizada.



Para o ensaio de toxicidade subcrônica 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. O projeto foi aprovado pelo CEUA sob protocolo número 30. Os animais foram divididos em 3 grupos, conforme segue: grupo controle (CTL) (n=8), que recebeu solução salina 0,9%, na dose de 10 mL/Kg, via oral; grupo EXP 1 (n=8), que recebeu o extrato de microalgas na dose 1500 mg/kg, via oral e o grupo EXP 2 (n=7), que recebeu o extrato de microalgas na dose de 2500 mg/kg, via oral. A administração dos três grupos ocorreu diariamente, durante 30 dias.

Durante este período, a cada 7 dias, foram realizadas observações clínicas comportamentais para detecção de sinais como piloereção, diarreia, atividade motora reduzida e lacrimação (MALONE e ROBICHAUD, 1983), além da época de seu aparecimento, intensidade, duração e progresso dos mesmos. Os dados foram tabulados em uma escala de 0 a 4 (ausente, raro, pouco, moderado, intenso) para posterior análise estatística. Além disso, foi calculado o índice de mortalidade nos diferentes grupos.

No último dia da administração, após eutanásia, o abdômen dos animais foi incisado para a avaliação macroscópica dos órgãos e coleta do fígado, rim, baço e cérebro para determinar os pesos absolutos e relativos.

A análise estatística dos dados referentes aos sinais clínicos de toxicidade foi realizada pelo teste de distribuição não paramétrica Kruskal Wallis do Bioestat, seguido do teste Student-Newman-Keuls. Os resultados foram expressos através de média \pm desvio padrão (média \pm DP) e considerou-se um nível de significância de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Índice de mortalidade

Verificou-se a morte de dois animais do grupo EXP 2, que recebeu extrato de microalgas na dose de 2500 mg/kg, as quais ocorreram no 3º e no 24º dia de exposição, o que representa um índice de mortalidade de 28,6% neste grupo, sugerindo que o extrato microalgáceo pode ser considerado tóxico na maior dose administrada durante o tratamento subcrônico de 30 dias. Nos demais grupos, CTL e EXP 1, não foram registradas mortes durante o experimento subcrônico.

Sinais clínicos de toxicidade

A Tabela 1 mostra os parâmetros de toxicidade nos diferentes grupos. Dentre os diferentes parâmetros analisados somente a piloereção foi constatada.

Tabela 1: Análise de sinais clínicos de toxicidade nos animais dos diferentes grupos.

Grupos/Parâmetros	CTL					EXP 1					EXP 2					Valor de p	
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		
Piloereção	Dias																
	1	8	0	0	0	0	7	1	0	0	0	4	1	0	0	0	0.8247
	7	8	0	0	0	0	6	2	0	0	0	4	1	0	0	0	0.6773
	14	8	0	0	0	0	6	2	0	0	0	4	0	1	0	0	0.6842
	21	8	0	0	0	0	0	4	3	1	0	1	0	3	1	0	*0.0020
	30	8	0	0	0	0	6	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0.4605

Os dados estão apresentados quanto ao número de animais que apresentaram cada escore (0 = ausente, 1 = raro, 2 = pouco, 3 = moderado, 4 = intenso). * Diferença significativa em relação ao grupo CTL com $p < 0,05$.



Avaliando os diferentes dias de tratamento, somente no 21º dia é que foi observada maior intensidade de piloereção significativa nos animais do grupo EXP 1 em relação ao grupo CTL. Salienta-se que somente este dado não é suficiente para determinar a toxicidade da dose de 1500 mg/kg do extrato de microalgas, pois é necessário o conjunto de diferentes parâmetros e protocolos de avaliação (SILVA et al., 2016).

Os estudos toxicológicos apresentam como principal objetivo a previsão dos possíveis efeitos adversos, que podem se manifestar quando da exposição humana à determinada substância química, seja ela um medicamento, um pesticida, um agente químico industrial ou outros (CAZARIN et al., 2004).

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 (BEDNARCZUK, 2010), a doses acumulativas de agente tóxico (MOURA et al., 2012). Para estes testes, a dose utilizada não deve ultrapassar 2000 mg/kg de peso corpóreo da substância testada (BEDNARCZUK, 2010; MOURA et al., 2012).

Frente aos resultados obtidos em relação ao grupo EXP 1, que recebeu o extrato de microalgas na dose de 1500 mg/kg, quanto ao índice de mortalidade (0%) e sinais clínicos de toxicidade, apesar de haver maior intensidade de piloereção ao final do tratamento, os dados não demonstraram, de uma maneira geral, alterações de caráter tóxico podendo ser considerada uma dose segura.

Em contrapartida, os animais tratados com o extrato de microalgas na dose de 2500 mg/kg, apresenta um índice de mortalidade de 28,6%, 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.

Peso 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, 2009).

O peso relativo e absoluto dos órgãos analisados não mostraram-se estatisticamente diferentes, conforme os dados representados nas Figuras 1 e 2, 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 e fígado podem ser de origem imunológica, inflamatória, infecciosa, neoplásica, degenerativa e toxicológica, entre outras (CUNHA, 2009), o que não ocorreu nos animais que foram expostos ao extrato microalgáceo. Os resultados encontrados neste experimento mostram, portanto, um equilíbrio de peso nos órgãos entre os animais dos diferentes grupos, demonstrando ausência de toxicidade nas vias metabólicas e de excreção.

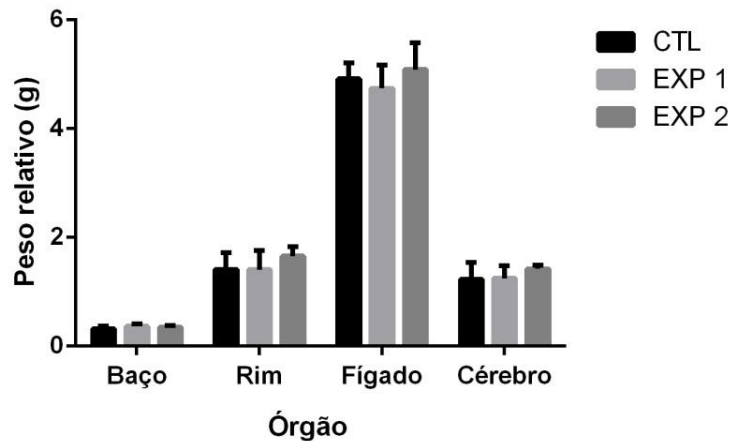


Figura 1: Peso relativo de órgãos dos animais de diferentes grupos. Os dados estão expressos em média±DP.

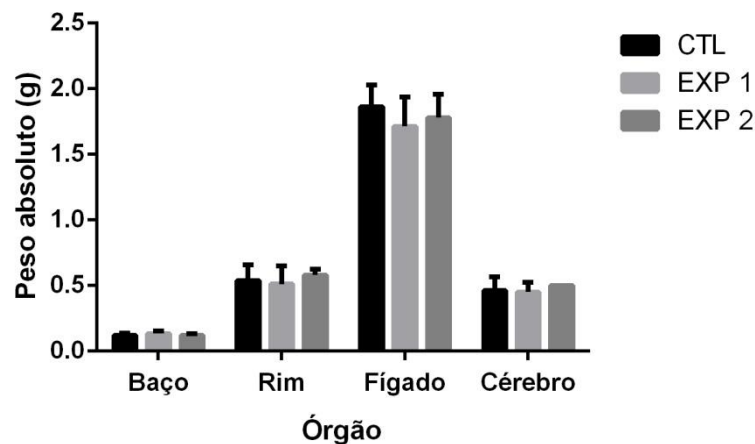


Figura 2: Peso absoluto de órgãos dos animais de diferentes grupos. Os dados estão expressos em média±DP.

Frente aos parâmetros de toxicidade avaliados, pode-se concluir que a administração subcrônica do extrato de microalgas contendo *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. na dose de 2500 mg/kg, pela via gavagem durante 30 dias foi considerada levemente tóxica em função da baixa letalidade, enquanto que a administração subcrônica do extrato na dose de 1500 mg/kg demonstrou maior segurança na administração durante 30 dias de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**, vol. 10. Cambridge University Press, 1994.

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**, v.11, n.2, Jul. - Dez., 2010.



IX SIMPÓSIO SUL DE GESTÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL
XXV SEMANA ALTO URUGUAI DO MEIO AMBIENTE
ENCONTRO DO COLETIVO EDUCADOR DO ALTO URUGUAI GAÚCHO
"Ações para a conservação da Biodiversidade"
DE 10 A 13 DE AGOSTO DE 2016

BONOTTO, S. Food and chemicals from microalgae. **Progress in Oceanography**, v. 21, n. 2, p. 207-215, 1988.

CAZARIN, K. C. C., CORRÊA, 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. et al. 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.

CUNHA, L. C. et al. 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, n. 2a, p. 403-411, 2009.

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

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

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

MOURA et al. Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15; p. 1946, 2012.

PEREIRA, A. M., LISBOA, C. R., FERREIRA, S. P., COSTA, J. A. V. Hidrolisados De *Chlorella pyrenoidosa*: Avaliação Da Solubilidade Proteica. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 4(2), 2012.

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

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

SAMPAIO, J. et al. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 4, p. 462-467, 2012.

SILVA, S. L. D. et al. Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.