

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE EDUCAÇÃO FÍSICA E FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENVELHECIMENTO HUMANO

***Spirulina platensis* COMO MIMETIZADOR DA
RESTRIÇÃO CALÓRICA EM RATOS**

Greici Konrath

Passo Fundo
2011

Greici Konrath

***Spirulina platensis* COMO MIMETIZADOR DA
RESTRIÇÃO CALÓRICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Envelhecimento Humano da Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Envelhecimento Humano.

Orientadora: Telma Elita Bertolin

Passo Fundo
2011

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA ALUNA

Greici Konrath

Ao primeiro dia do mês de abril do ano dois mil e onze, às nove horas, realizou-se, na Faculdade de Educação Física e Fisioterapia da Universidade de Passo Fundo, a sessão pública de defesa da Dissertação: "Spirulina platensis COMO MIMETIZADOR DA RESTRIÇÃO CALÓRICA EM RATOS", apresentada pela mestranda Greici Konrath, que concluiu os créditos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Envelhecimento Humano. Segundo os encaminhamentos do Conselho de Pós-Graduação (CPG) do Mestrado em Envelhecimento Humano e dos registros existentes nos arquivos da Secretaria do Programa, a aluna preencheu todos os requisitos necessários para a defesa. A banca foi composta pelos professores doutores Telma Elita Bertolin - orientadora e presidente da banca examinadora (UPF), Hugo Roberto Kurtz Lisboa e Luciane Maria Colla. Após a apresentação e a arguição da dissertação, a banca examinadora considerou a candidata APROVADA, em conformidade com o disposto na Resolução Consun N° 07/2010. A banca recomenda a consideração dos pareceres, a realização dos ajustes sugeridos e a divulgação do trabalho em eventos científicos e em publicações. Encerrados os trabalhos de defesa e proclamados os resultados, eu, Profª. Drª. Telma Elita Bertolin, presidente, dou por encerrada a sessão pela banca.

Passo Fundo, 01 de abril de 2011.

Profª. Drª. Telma Elita Bertolin
Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Hugo Roberto Kurtz Lisboa
Universidade de Passo Fundo

Profª. Drª. Luciane Maria Colla
Universidade de Passo Fundo

CIP – Catalogação na Publicação

K82s Konrath, Greici
Spirulina platensis como mimetizador da restrição calórica em ratos
/ Greici Konrath. – 2011.
80 f. : il. ; 30 cm.

Orientação: Prof. Telma Elita Bertolin.
Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade
de Passo Fundo, 2011.

1. Idosos – Cuidado e higiene. 2. Alimentos – Teor calórico. 3.
Animais de laboratório. 4. Longevidade. I. Bertolin, Telma Elita,
orientadora. II. Título.

CDU: 613.98

Catálogo: Bibliotecária Ângela Saadi Machado - CRB 10/1857

Konrath, Greici. **Spirulina platensis como mimetizador da restrição calórica em ratos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Envelhecimento Humano) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, que souberam compreender e aceitar a minha escolha. E compartilharam comigo todas as vitórias e amarguras do caminho que escolhi seguir.

Sou grata pela maior riqueza que vocês poderiam me dar: minha educação e formação.

Obrigada por acreditarem no meu êxito!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^ª. Telma Elita Bertolin, pela confiança em mim depositada. Por permitir que eu fizesse parte da sua equipe, me incentivar constantemente e querer sempre o melhor pra mim. Espero ter correspondido às expectativas! Agradeço a oportunidade, o apoio, o incentivo e a amizade.

À Luciane Colla, que me permitiu ir além da relação aluno/professor. Muito obrigada por ter me ajudado em todos os momentos, desde antes do ingresso no mestrado até o último dia que eu precisei. Suas palavras nunca foram em vão...

À querida Amanda que me manteve informada sobre tudo, colaborou em meu experimento, na qualificação em toda parte burocrática e sempre que precisei.

Às meninas do Laboratório de Ciências Biológicas, que me salvaram de vários momentos delicados.

À Dona. Ledí, com sua experiência no manuseio com os ratos. Muito obrigada pela grande colaboração.

Ao meu marido... Sem você todo este trajeto não teria tido a mesma graça.

À minha cachorrinha Happy que me fez companhia todas as vezes que trabalhei em casa. Às vezes me distraíndo, porém alegrando as tardes e noites que trabalhei na minha pesquisa.

Ao bioterista Sérgio, pela atenção e cuidado com meus ratinhos.

Aos ratos, não somente um objeto de estudo. Eterno agradecimento pela passividade.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

RESUMO

A restrição calórica (RC) pode atrasar ou prevenir doenças relacionadas à idade em diferentes espécies, variando de leveduras a primatas. Embora a aplicação deste regime em humanos permaneça incerta, a proporção de benefícios da RC poderia acrescentar mais anos saudáveis para a vida média do que até mesmo uma cura para o câncer ou doenças cardíacas. Em função de que poucas pessoas estariam dispostas a manter um estilo de vida sob RC, a busca por substâncias que possam imitar os seus efeitos benéficos a saúde e a longevidade, apresenta-se com importância na atualidade. O uso da cianobactéria *Spirulina platensis* tem mostrado capacidade de aumentar o tempo de vida de modelos como leveduras e roedores visto suas propriedades funcionais, afora os benefícios para a saúde do homem. Para tal, 30 ratos Wistar, adultos foram submetidos aos tratamentos: controle (C), restrição calórica (RC) e *Spirulina platensis* (Sp). O presente trabalho objetivou verificar o potencial mimetizador da microalga *Spirulina platensis* nos efeitos benéficos da restrição calórica. Para o tratamento *Spirulina platensis* a ração padrão para ratos foi acrescida de 1,5 g de *Spirulina platensis*/Kg de ração; para o grupo restrição calórica fez-se a diminuição de 30 % da dieta comparados ao grupo controle. Os parâmetros analisados foram: massa corporal, glicemia, TBARS e perfil lipídico, através das medidas de colesterol total, HDL, LDL e TGA. Os resultados obtidos revelam que a massa corporal do grupo RC se manteve, porém nos grupos C e Sp aumentaram significativamente ($p < 0,001$). Os níveis de TGA se mantiveram nos grupos RC e Sp e aumentaram no grupo C ($p = 0,0039$). O colesterol HDL não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$). Os valores de LDL aumentaram no grupo C ($p = 0,0075$) e nos grupos RC e Sp se mantiveram. O colesterol total diminuiu de forma significativa apenas no grupo RC ($p < 0,05$). Os índices de TBARS diminuíram significativamente nos grupos RC e Sp ($p < 0,001$) comparados ao grupo controle. Os níveis de glicose não sofrem alterações na comparação pré e pós-tratamentos para os diferentes grupos. Os resultados dos efeitos benéficos nos níveis de TGA, colesterol LDL, lipoperoxidação lipídica (TBARS) e manutenção do peso pelo uso da *Spirulina platensis* no processo de envelhecimento de ratos, neste estudo, indica que esta cianobactéria pode ser utilizada como um funcional mimetizador da restrição calórica.

Palavras-chave: 1. Restrição Calórica. 2. *Spirulina platensis*. 4. mimetismo. 5. longevidade.

ABSTRACT

Caloric restriction (CR) can delay or prevent diseases related to age in different species, varying from yeast to primates. Although the application of this diet in humans remain uncertain, the proportion of the benefits of CR could add more healthy years to average life than even the cure of cancer or heart diseases. As a few people would be willing to maintain a life style under CR, the search for substances that can mimic their beneficial effects, health and longevity seem to be very important nowadays. The use of cyanobacteria *Spirulina platensis* has shown to increase life time of models like yeast and rodents because of its functional properties. The present work objectified to verify platensis the mimetizator potential of the microseaweed *Spirulina* in the beneficial effect of the caloric restriction. For that, 30 adult rats Wistar were submitted to treatments: control (C), caloric restriction (CR) and *Spirulina platensis* (Sp). For treatment *Spirulina platensis* the standard rat chow was increased with 1.5 g of *Spirulina platensis*/Kg chow; for group caloric restriction the reduction of 30 % in diet was made compared to control group. The parameters evaluated were: weight, glucose, TBARS and lipid profile, through measures of total cholesterol, HDL, LDL and TGA. The results obtained show that the body mass of group CR was kept, thus groups C and Sp increased significantly ($p < 0.001$). The levels of TGA remained in groups CR and Sp and increased in group C ($p = 0.0039$). HDL cholesterol showed no significant difference ($p > 0.05$). The values of LDL increased in group C ($p = 0.0075$) and in groups CR and Sp, remained. Total cholesterol reduced significantly in group RC only ($p < 0.05$). The indexes of TBARS reduced in groups CR and Sp compared with the control group. The levels of glucose did not changed when compared to pre and post treatments to different groups. The results of the beneficial effect in the levels of TGA, lipidic cholesterol LDL, lipoperoxidation (TBARS) and maintenance of the weight for the platensis use of the *Spirulina* in the process of aging of rats, in this study, indicate that this cyanobactéria can be used as a mimetizator functionary of the caloric restriction.

Key-words: 1. Caloric restriction. 2. *Spirulina platensis* . 3. mimetism. 4. longevity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Manutenção da massa corporal dos ratos do grupo RC	37
Figura 02 - Aumento significativo nos valores de TGA no grupo C	40
Figura 03- Aumento significativo do colesterol HDL no grupo RC	42
Figura 04 - Aumento significativo do colesterol LDL no grupo C	44
Figura 05 - Redução do colesterol total no grupo RC	49
Figura 06- Diminuição nos níveis de TBA nos grupos Sp e RC	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição da microalga <i>Spirulina platensis</i>	23
Tabela 2 Delineamento dos tratamentos	31
Tabela 3 Composição da ração padrão para ratos, Nuvital®	31
Tabela 4 Valores das massas corporais (Kg) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e 120 dias	36
Tabela 5 Valores de triacilgliceróis (mg/ dL) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e 120 dias	39
Tabela 6 Valores de colesterol HDL (mg/dL) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e 120 dias	41
Tabela 7 Valores de colesterol LDL (mg/dL) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e 120 dias	43
Tabela 8 Valores de glicose (mg/dL) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e 120 dias	46
Tabela 9 Valores do colesterol total (mg/dL) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e 120 dias	48
Tabela 10 Valores de TBA (nmol) para os diferentes tratamentos nos tempos zero e 120 dias	50

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Life span</i>	Prolongamento da vida
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CT	Colesterol Total
EO	Estresse Oxidativo
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Sp	<i>Spirulina platensis</i>
TGA	Triacilgliceróis
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
MDA	Malonaldeído
RL	Radicais Livres
TBA	Ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. ENVELHECIMENTO	15
2.2. RESTRIÇÃO CALÓRICA	17
2.3. <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>	22
2.4. ANTIOXIDANTES, RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO	30
3.2. MODELO EXPERIMENTAL	30
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.3.1 TRATAMENTO CONTROLE	31
3.3.2. TRATAMENTOS <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>	32
3.3.3. TRATAMENTO RESTRIÇÃO CALÓRICA	32
3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	32
3.4.1. CONSUMO ALIMENTAR	32
3.4.2. CONTROLE DE PESO	33
3.4.3. SACRIFÍCIO	33
3.4.4. ANÁLISES SÉRICAS	33
3.4.5. PROCEDIMENTOS DE PREPARO	33
3.4.6. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO	34
3.4.7. ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO	34
3.4.8. ANÁLISE DA GLICOSE	35
3.4.9. TRATAMENTO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXO	
PARECER DE APROVAÇÃO DE PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS.	66

1. INTRODUÇÃO

Diferentes pesquisas demonstram que a restrição calórica atrasa ou previne doenças relativas ao aumento da idade e prolongam a vida de diferentes espécies de seres vivos desde leveduras até primatas e humanos.

A restrição calórica é uma dieta que se caracteriza por uma redução de calorias na ausência de subnutrição. Este regime foi descrito inicialmente por McCay e colaboradores em 1935. Outros importantes estudos vêm sugerindo que a restrição calórica tem a capacidade de aumentar a longevidade, a saber: Friedman e Joinhson em 1988 com nematódeos, em 1996 Brown-Borg em estudo com roedores, em 2005, Mazzero testando o modelo experimental leveduras e mais recentemente em 2009, Colman relatou resultados da restrição calórica com primatas. O estudo de Colman vem sendo apresentado na mídia como a prova que faltava para a transposição dos benefícios da restrição calórica para o humano.

A restrição calórica de acordo com estes autores previne ou retarda o aparecimento da maioria das causas de morbidade e ou mortalidade, tais como câncer, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas e diabetes. Esta proteção de acordo com estudos recentes acontece principalmente pela atenuação do estresse mitoncodrial e pela mediação da indução de um gene chamado *silent information regulator 2* (regulador de informação silenciosa, ou apenas Sir2) que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de nicotinamida

adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (FONTANA et al, 2010; EVANS et al, 2010). Este evento bioquímico promove um aumento na relação NAD⁺/NADH, e tem sido discutido como um promotor de *life span* nestes organismos (LIN et al, 2004).

No entanto como é improvável que uma grande proporção da população humana estaria disposta ou capaz de manter um estilo de vida sob restrição calórica, surge na atualidade um interessante e crescente interesse em estudar moléculas e ou substâncias funcionais que mimetizem os efeitos benéficos da restrição calórica.

A cianobactéria *Spirulina platensis* devido a seus componentes moleculares vem sendo relatada como atenuadora do estresse oxidativo (KHAN, 2005), antiinflamatória (CHAMORRO et al, 2002; LEE, 2008)., anticolesterolêmica (BERTOLIN et al, 2009), como antioxidante (Estrada et al, 2001, Guarienti, Bertolin e Costa, 2010, BHAT, MADYASTHA, 2001), e também atenuando os níveis do perfil lipídico e de glicose (DROGE, 2002; BERTOLIN et al, 2009; COSTA et al, 2002; BAST, 1991).

Entretanto, ainda permanece a falta de evidências mais elucidativas sobre os mecanismos biológicos que favorecem o *life span* pela restrição calórica bem como das dosagens de moléculas funcionais para mimetizar a restrição calórica.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou verificar o potencial mimetizador da microalga *Spirulina platensis* nos efeitos benéficos da restrição calórica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENVELHECIMENTO

A sociedade sofreu mudanças drásticas nas últimas décadas, onde o número de filhos passou de seis para dois, em um intervalo de uma geração (KALACHE, 2007). Este declínio na fecundidade proporcionou redução na velocidade do crescimento populacional, onde se estima que a população pare de crescer em 30 anos no Brasil, atingindo o chamado “crescimento zero” em 2039.

A redução de nascidos vem acompanhada de um aumento na longevidade dos brasileiros. Em 1940 a expectativa de vida ficava em torno dos 50 anos, hoje está em 72 anos e, em 2050 estima-se que alcançará 81 anos. Esta realidade demonstra que o Brasil era considerado jovem e daqui a 30 anos tornar-se-á ambiente de uma população envelhecida, trazendo mais preocupações de políticas públicas, do que méritos por essa titulação.

O processo de envelhecimento caracteriza-se por alterações no organismo com o decorrer do tempo, gerando um decréscimo nas suas respostas. Ocorre, neste período, o declínio das funções fisiológicas, levando a quebra da homeostase, maior suscetibilidade a doenças e morte do organismo. O envelhecimento não pode ser confundido com doença, já que muitos idosos gozam de boa saúde. O fato é que algumas alterações físicas aparecem

nesta fase, proporcionando desequilíbrio nas funções e levando a algumas doenças crônico-degenerativas (GIL et al, 2006).

Quando a capacidade de adaptação do organismo for reduzida e/ou se a ação dos fatores que geram danos aos organismos for aumentada, não necessariamente todos ao mesmo tempo, têm-se o início do processo do envelhecimento, pela falta de habilidade do organismo, com o avançar da idade, em recuperar-se dos processos de agressão a que é continuamente exposto (AFANAS'EV, 2005).

A fim de explicar o evento do envelhecimento existem várias teorias: as de natureza genética - desenvolvimentista e as de natureza estocástica. As primeiras entendem o envelhecimento no contexto de um continuum controlado geneticamente, enquanto as últimas trabalham com a hipótese de que o processo dependeria, principalmente, do acúmulo de agressões ambientais (FARINATI, 2002).

De acordo com Askot e Ali (1999), muitas das teorias que explicam o processo do envelhecimento estão obsoletas. Dentre as que estão sendo estudada, a teoria do envelhecimento pelos radicais livres é uma das mais abrangentes e aceitas na atualidade.

Para proteger a célula desses subprodutos destrutivos, os organismos contam com seus sistemas de defesa, os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. (LENHINGER; NELSON; COX, 2000). O uso de estratégias como a restrição calórica (MASORO, 1991) o exercício físico (MOTA; FIGUEREDO; DUARTE, 2004), entre outros, pode evitar a sobrecarga dos sistemas naturais e, ainda, prevenir a formação de radicais livres.

A maior parte dos estudos (realizados com modelos animais) vem procurando observar os efeitos da restrição calórica sobre processos fisiológicos e patológicos específicos, na tentativa de encontrar possíveis explicações para o aumento da longevidade. A explicação através da diminuição de danos moleculares oxidativos pela restrição calórica sobre o aumento das defesas antioxidantes ou renovação celular é uma das hipóteses. (FARINATTI, 2002; BERTOLIN et al, 2008; DROGE, 2002; GENARO et al, 2009; MASORO, 2001; RACETTE et al, 2006; KUA CHONG-HAN, 2010; GIL DEL VALLE , 2010).

2.2. RESTRIÇÃO CALÓRICA

A restrição calórica (RC) é definida como uma redução da ingestão calórica abaixo do *ad libitum*, sem desnutrição. Ela é uma das formas de intervenção nutricional mais amplamente discutidas para se estender o tempo de vida em uma variedade de espécies, inclusive mamíferos (ROTH et al, 2001; BORDONE et al; 2005; KUA CHONG-HAN,2010; SKINNER , LIN , 2010).

As várias teorias que procuram explicar o envelhecimento do ponto de vista biológico enfatizam o controle genético do envelhecimento celular e ou as agressões externas a que são expostos os organismos (FARINETTI, 2002). Em relação às teorias do desgaste celular uma das hipóteses que vem sendo investigada é a restrição calórica sistemática. Esta linha de pesquisa data de 1935 quando, MacCay e colaboradores propuseram que a restrição alimentar em ratos poderia ter impacto sobre sua longevidade. Desde então, muitos são os estudos que examinam os efeitos dessa variável sobre o processo de envelhecimento (GENARO, 2009; GÓMEZ-PINILLA, 2008; RACETTE et al, 2006; DROGE, 2002; FARINATTI, 2002; MASORO, 2001;).

O acúmulo de danos celulares e morte têm sido associados ao estresse oxidativo. A restrição calórica é uma intervenção que vem sendo estudada exaustivamente na expectativa de aumento da vida útil e redução da taxa de envelhecimento. Mecanismos responsáveis pelo efeito antienvelhecimento da restrição calórica permanecem incertos, mas a redução do estresse oxidativo na mitocôndria continua a ser o principal foco da investigação. A restrição calórica é a hipótese de diminuir o fluxo de elétrons mitocondrial e vazamentos de prótons para atenuar os danos causados por espécies reativas de oxigênio (HUNT et al, 2005; SKINNI; LIN, 2010; RISTOW, 2010).

Estudos têm demonstrado que a restrição calórica aumenta a expectativa de vida em ratos, cachorros e macacos chegando a um incremento de 40 % a 50 % na extensão de vida em ratos machos e ratos fêmeas alimentados com uma quantidade reduzida de calorias, mas com uma nutrição adequada. Também, foi observado que o mesmo resultado era obtido em roedores alimentados em dias alternados, revelando que ambos os grupos apresentavam um decréscimo na glicose e insulina (SELIGNAM, 2007).

Outro mecanismo que poderia explicar o efeito do consumo calórico no envelhecimento está relacionado com a redução da gordura corporal, às espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas durante a respiração que causam danos oxidativos ao DNA e RNA das células promovendo assim o processo de envelhecimento e o aumento do risco de doenças. Mudanças na composição de ácido graxo dos fosfolípidios do fígado, dos rins, do coração, do cérebro, e do músculo esquelético, por exemplo, foram observados depois de um mês de restrição calórica em um estudo feito por Sally et al (2006).

Feurs (1998) mostrou que camundongos submetidos à alimentação com farta disponibilidade de calorias, têm sua vida diminuída, quando comparados com camundongos alimentados com dieta contendo 30 % menos calorias que o usual. O autor relata que a restrição calórica tem efeito sob a diminuição na taxa de metabolismo basal, resultando em um aumento da longevidade pela preservação da atividade respiratória da mitocôndria.

Pinilla- Gomez (2008) relata que o dano oxidativo também ocorre no cérebro e é altamente suscetível ao estresse. Em um estudo sobre os efeitos dos alimentos nas funções cerebrais ele verificou que alguns alimentos apresentaram influência sobre os processos celulares vitais para a manutenção das funções cognitivas, o que, segundo o pesquisador levanta a possibilidade de que manipulações alimentares, como a restrição calórica, o uso de antioxidantes naturais, de ácidos graxos ricos em ômega-3, caracterizam-se como uma estratégia viável para reforçar a capacidade cognitiva do cérebro, promovendo reparações nos efeitos do envelhecimento.

Sohal (1996) objetivou compreender a natureza das causas subjacentes a senescência relacionados com declínio na massa muscular esquelética e desempenho. O dano oxidativo das proteínas e lipídios da mitocôndria do músculo esquelético da pata superior foi comparado entre os ratos alimentados *ad libitum* e os limitados a 40 % menos de calorias. O dano oxidativo mitocondrial de proteínas aumentou significativamente com a idade nos alimentados *ad libitum*. A taxa de geração do radical ânion superóxido por partículas submitocondriais que aumentaram as atividades de enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no músculo permaneceu inalterada com a idade no grupo *ad libitum*. Nos camundongos com RC não mostrou aumento da idade associados às

proteínas mitocondriais ou dano oxidativo dos lipídios, ou na geração radical ânion superóxido.

Os resultados deste estudo indicam que as mitocôndrias dos músculos esqueléticos acumulam quantidades significativas de dano oxidativo durante o envelhecimento. Embora grande parte desses danos seja irreversível, ela pode ser prevenida pela restrição da ingestão calórica.

Hunt et al, (2006) sugerem que o acúmulo de dano oxidativo induzido pela idade e outras mudanças podem ser atenuados por um longo prazo de regime de restrição calórica com a redução da ingestão de uma dieta nutritiva por 20-50 % abaixo dos níveis *ad libitum*. A restrição calórica, em razão de sua capacidade de proteger as células contra os danos gerados por espécies reativas de oxigênio mitocondrial, e peroxidação lipídica, parece poder atenuar o processo do envelhecimento (BERTOLIN et al, 2008).

De acordo com Genaro (2009) informações disponíveis sugerem que a redução de 20 % a 30 % de calorias na dieta de roedores parece diminuir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, porém o efeito da restrição calórica na longevidade em humanos ainda não está bem estabelecido e carece de maiores informações a cerca dos mecanismos celulares e moleculares responsáveis pelos efeitos terapêuticos da restrição calórica.

Outro mecanismo que vem sendo estudado para compreender os efeitos da restrição calórica sobre a longevidade é a influência de uma proteína chamada sirtuina. Em humanos esta proteína é codificada pelo gene SIRT 1.

Ela parece promover a sobrevivência neuronal nas doenças neurodegenerativas associadas com a idade; desenvolver complexas funções sistêmicas na função cardíaca; no reparo do DNA e na estabilidade genômica e ainda parece aumentarem a plasticidade sináptica, as conexões entre os neurônios e a formação da memória. Esta proteção acontece pela mediação da indução de um gene chamado *silent information regulator 2* (regulador de informação silenciosa, ou apenas Sir2) que codifica uma enzima, a histona desacetilase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (FONTANA et al, 2010; EVANS et al, 2010). O aumento da relação NAD⁺/NADH tem sido discutido como um promotor de *life span* nestes organismos (LIN et al, 2004).

As diferentes investigações relativas ao uso da terapia da dieta sob restrição calórica (ROTH et al, 2001; MASORO, 2001; DROGE, 2002; BORDONE et al; 2005; HUNT, 2006; RACETTE et al, 2006; SELIGMAN, 2007; BERTOLIN et al, 2008; GÓMEZ-PINILLA, 2008; COLMAN et al, 2009; GENARO, 2009; KUA CHONG-HAN, 2010; SKINNER, LIN , 2010) além de mostrarem os benefícios da RC no *life span* em modelos experimentais que vai desde leveduras até primatas também, vem evidenciando resultados comparativos do uso de dieta sob restrição calórica com substâncias e ou moléculas que possam mimetizar os seus efeitos (BAUR, 2010).

A cianobactéria *Spirulina platensis* vem sendo estudada por diferentes pesquisadores como um funcional de capacidades terapêuticas muito significativas na atenuação de diferentes patologias do envelhecimento e por consequência na longevidade.

Neste olhar o presente estudo buscou verificar a capacidade desta cianobactéria em mimetizar os benefícios da restrição calórica.

2.3 *Spirulina platensis*

O uso de suplementos alimentares e nutricionais tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores (ESTRADA et al, 2001). Os diferentes resultados registram que substâncias que apresentam na sua composição, por exemplo, compostos fenólicos podem não só aumentar a sustentação alimentar, mas também atuar como antioxidantes em muitos sistemas biológicos reduzindo a incidência de doenças e morte (MILIE et al, 1998; BELAY, 2002).

A utilização da microalga *Spirulina platensis* e seus componentes têm sido bastante discutidos na literatura específica (KUA CHONG-HAN, 2010; BERTOLIN et al, 2009; COLLA et al, 2008; TORRES-DURAN, 2007; KHAN, 2005; ESTRADA et al, 2001; GRINSTEAD et al, 2000; TRANQUILLE, 1994; CONTRERAS et al, 1979) na perspectiva de que esta atue como suplemento alimentar, como fonte potencial para emprego na prevenção e no tratamento de várias enfermidades como na hiperlipidemia, na obesidade, no diabetes mellitus, na melhora do sistema imunológico, na toxicidade renal, na hipertensão arterial, no câncer, efeitos radioprotetor, efeitos antivirais, efeitos na microbiota intestinal e na desnutrição tem sido citados (AMBROSI, 2009).

A Tabela 1 apresenta a composição nutricional da microalga *Spirulina platensis*.

Tabela 1 Composição da microalga *Spirulina platensis*

Composição Geral	Minerais mg/g	Vitaminas mcg/g	Fitonutrientes mg/g
53-62 % proteína	14 de cálcio	Vitamina A	Beta-Caroteno 9
17-25 % carboidratos	23 Magnésio	Vitamina B1	Clorofila 24
4-6 % lipídios	1,6 de ferro	Tiamina 75	Carotenóides totais 13
8-13 % Minerais	30 Fósforo	Vitamina B2	Ficocianina 360
3-6 % umidade	56 de potássio	Riboflavina 110	Superóxido dismutase
	42 Sódio	Vitamina B3	
	0,096 Manganês	Niacina 450	
	0,081 Zinco	Vitamina B6	
	0,090 Boro	Vitamina E	
	0,021 Cobre	Inositol 1,7	
	0,012 Molibdênio	Biotina 0,8	
	0,001 Selênio	Ácido Fólico 4,5	

A microalga *Spirulina* comparado com outros alimentos tem 300 % mais cálcio que o leite; 2300 % mais ferro que o espinafre; 3900 % mais beta-caroteno de cenouras. Três gramas de *Spirulina* têm mais antioxidantes e antiinflamatórios que a atividade de cinco porções de legumes. Comparando-se os níveis de fitonutrientes, *Spirulina* é 31 vezes mais potente do que mirtilos, 60 vezes mais potente que o espinafre e 700 vezes mais potente que as maçãs (MOORHEAD et al, 2006).

Estudos científicos apresentaram os benefícios potenciais da *Spirulina* experimentalmente provado, “in vivo” e “in vitro” a microalga foi eficaz no tratamento de algumas alergias, anemia, câncer, hepatotoxicidade (toxicidade do fígado), anti-virais e doenças cardiovasculares, hiperglicemia, hiperlipidemias, imunodeficiência, e processos inflamatórios, entre outros. Várias dessas atividades são atribuídas a si própria ou a alguns de seus componentes, incluindo ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, beta-caroteno, alfa-tocoferol, ficocianina e compostos fenólicos, e recentemente um complexo isolado, o Cálcio Spirulan (CHAMORRO et al, 2002).

As substâncias presentes na microalga são apresentadas como participantes na atenuação dos danos celulares provenientes do desequilíbrio entre a formação de radicais livres e espécies reativas e as defesa antioxidante, ou seja, o estresse oxidativo. Dessa forma, a suplementação alimentar com um produto natural como *Spirulina*, pode contribuir como uma estratégia para administrar todas as questões referentes a diferentes doenças (BELAY, 2002).

2.4. ANTIOXIDANTES, RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Um antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, relativamente às concentrações de substratos oxidáveis, atenua a oxidação desses substratos por espécies reativas de oxigênio (ASKOT et al, 1999). A interação entre estresse oxidativo, defesa antioxidante e doenças relacionadas ao envelhecimento é complexa e as informações sobre o assunto, tem trazido novas e instigantes questões.

A produção dos radicais livres se realiza através de uma reação em cadeia, que, partindo de radicais relativamente pouco tóxicos, como o ânion superóxido, leva à formação de substâncias altamente lesivas. O organismo, porém, é capaz de desativar os radicais livres antes de exercerem seu efeito danoso, utilizando substâncias antioxidantes. (PORTO, 2005).

Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de garantir a manutenção do estado redox celular, isto é, promover eficiente eliminação dos radicais livres produzidos pelo metabolismo basal e, por consequência, proteger contra as lesões oxidativas desencadeadas pelos radicais livres (DRÖGE, 2002).

Em sistemas biológicos quando existe um desequilíbrio entre a taxa de produção de radicais livres e a taxa de remoção destes pela defesa antioxidante, caracteriza-se um desbalanço redox temporário (DRÖGE, 2002).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA, 2004).

O sistema de defesa antioxidante enzimático superóxido dismutase (SOD) é encontrada no citosol (Cu/Zn-SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD); glutathione peroxidase (GSHPx) e catalase (CAT), presentes no citosol e peroxissomos, respectivamente (NORDBERG, ARNER, 2001; FINKEL, HOLBROOK, 2000).

Para proteger a célula dos subprodutos destrutivos, o organismo conta com seus sistemas de defesa endógeno (LENHINGER et al, 2002), porém com o envelhecimento estes sistemas são enfraquecidos (PARSONS, 2003).

Estas moléculas reativas podem ser geradas por fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas originam-se de processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons. Esta geração de radicais livres

envolve várias organelas celulares, como mitocôndrias, lisossomos, peroxissomos, núcleo, retículo endoplasmático e membranas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002).

As defesas antioxidantes exógenas podem constituir-se de vitaminas e minerais presentes na dieta. A terapia antioxidante parece promissora em atenuar os efeitos da produção descontrolada de radicais livres. A *Spirulina platensis*, por exemplo, apresenta na sua composição substâncias com capacidade de reagir com as EROS geradas durante o processo oxidativo, como também propriedades possuidoras de grande potencial farmacêutico por reduzir o colesterol LDL (ESTRADA, 2001; COLLA, COSTA, BERTOLIN, 2008; BERTOLIN, 2009).

O envolvimento dos radicais livres (RL) no fenômeno de envelhecimento e na doença foi proposto pela primeira vez por Harman em 1966. A teoria dos radicais de oxigênio, desenvolvida por ele propunha que o envelhecimento poderia ser secundário ao estresse oxidativo, que levaria a reações de oxidação lipídica, protéica, e com o DNA, que desencadeariam alterações lentas e progressivas dos tecidos e do código genético. Este autor considera que o fenômeno de envelhecimento é o resultado da acumulação de lesões moleculares provocadas pelas reações dos radicais livres nos componentes celulares ao longo da vida, que conduzem à perda de funcionalidade e à doença com o aumento da idade, conduzindo à morte (HARMAN, 1972, apud FARINETTI, 2002).

Os seres vivos dependem do oxigênio para manter suas funções vitais, sendo que 95% do total são usados para formar energia por diferentes processos enzimáticos. Entretanto, 5% de oxigênio participam da formação de radicais livres (KOURY, 2003), em função disso, o O₂

tem-se se revelado prejudicial para os seres que o utilizam, danificando as estruturas celulares e intracelulares dos organismos aeróbios (VOLLARD, SHEARMAN e COOPER, 2005).

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. De maneira simples, o termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, os átomos ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebe outro, reduzindo-se. Portanto, os radicais livres ou provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução. Como em sua maioria os radicais livres são derivados do metabolismo do O₂, o termo “espécies reativas do metabolismo do oxigênio” (ERMO) é utilizado (FERREIRA, 1997). Estas espécies intervêm nos transtornos do metabolismo podendo estar relacionados com a etiologia de várias doenças como: cardiopatias, aterosclerose, câncer pulmonar, Alzheimer, Parkinson, entre outras (FINKEL, HOLBROOK, 2000).

As mudanças degradativas, do processo do envelhecimento e da doença, podem ser devidas aos radicais livres (HARMAN, 1972; BARJA, 2004; CORRÊA, 2006; CHEN et al, 2007; LJUBUNCIC, 2009), e em geral, a taxa de EROs, formada a partir dos radicais livres, em diferentes espécies tem correlação com a expectativa de vida (SQUIER, 2001).

A intensidade e patogenicidade destes desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação

com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, em que fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes (GROW, 2001).

A redução completa dos radicais livres processa-se na mitocôndria e a cascata de acontecimentos químicos que a compõem é simultânea e leva à formação de uma molécula de água. Este fenômeno oxidativo pode também, em escala menor, ser seqüencial e levar à formação de metabólitos intermediários que são radicais livres. O metabolismo celular produz normalmente radicais livres em razão da auto-oxidação de certas moléculas pequenas ou pela atividade de diversas enzimas. (PORTO, 2005).

Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROs, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente. Em circunstâncias fisiológicas, existe um contínuo desequilíbrio entre a produção e a inativação de compostos instáveis (radicais livres), sempre favoráveis à sua produção. Esta situação, presente em repouso, e aparentemente fisiológica, é conhecida por estresse oxidativo (MOTA, FIGUEIREDO, DUARTE, 2004; VOLLAARD, SHEARMAN, COOPER, 2005; CORRÊA, 2006). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio.

A busca pela determinação das reais influências do dano oxidativo, revela-se de grande importância, com perspectivas de aplicação clínica para diagnóstico de doenças e do

estado geral de saúde do indivíduo. Além disso, o entendimento dos mecanismos utilizados pelas células para a manutenção do balanço redox do meio é fundamental na identificação de biomarcadores representativos para a avaliação do nível de estresse oxidativo de diferentes indivíduos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é longitudinal e de intervenção.

3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

Os experimentos foram realizados no Biotério Central, no Laboratório de Bioquímica do ICB e no Laboratório de Fermentações do Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade de Passo Fundo. As análises foram realizadas no Departamento de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade de Passo Fundo.

3.2. MODELO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento dos experimentos foram utilizados 30 ratos (*Wistar hannover*) machos os quais, foram mantidos no Biotério Central da UPF com ciclo invertido claro/escuro de 12/12, com início do período claro de 6 h com ambiente e temperatura natural. Os animais foram separados em gaiolas individuais para melhor controle alimentar.

3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A Tabela 2 apresenta a descrição dos tratamentos experimentais.

Tabela 2 Delineamento dos tratamentos

Tratamentos experimentais	Nº de ratos	Sigla dos tratamentos	Características dos tratamentos
Controle	10	C	Ração padrão para ratos
<i>Spirulina platensis</i>	10	Sp	Ração acrescida de <i>Spirulina</i>
Restrição Calórica	10	RC	Ração menos 30 % da dieta C

3.3.1. TRATAMENTO CONTROLE (C)

Os ratos submetidos à dieta controle (C) receberam ração padrão para roedores, balanceada de acordo com as recomendações do *National Research Council e National Institute of Health* (USA), da marca Nuvital, tipo Nuvilab CR1.

A quantidade de ração oferecida ao grupo controle foi de 20 g/dia (consumo médio de um rato adulto). Este valor foi baseado no Manual para Técnicos em Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 1994).

A Tabela 3 apresenta a composição da ração utilizada para alimentar os ratos.

Tabela 3 Composição da ração padrão para ratos, Nuvital ®

Componentes	Quantidades
Proteína	22 %
Extrato etéreo	4 %
Material mineral	10 %
Matéria fibrosa	8 %
Cálcio	1,40 %
Fósforo	0,80 %
Antioxidante	100,00 mg

3.3.2. TRATAMENTO *Spirulina platensis* (Sp)

Para o grupo tratado com *Spirulina platensis* (Sp) a ração padrão foi adicionada de 1,0 g de *Spirulina platensis* para cada Kg de ração. O dobro do recomendado pela ANVISA.

A *Spirulina platensis* foi obtida da Universidade Federal do Rio Grande/FURG, Laboratório de Engenharia Bioquímica/ Engenharia de Alimentos. O preparo da ração constitui-se na moagem da mesma em moinho de bolas para sua total pulverização. Na seqüência, a ração foi acrescida com *Spirulina platensis* na quantidade previamente calculada para o tratamento. Esta ração foi submetida a uma nova peletização e secada em estufa com circulação de ar a 60 ° C por 24 horas. Para o preparo deste tratamento foi utilizada gelatina em folha, sem sabor, (1 e ½ para cada Kg de ração) com o objetivo de formação de liga.

3.3.3. TRATAMENTO RESTRIÇÃO CALÓRICA (RC)

A dieta do grupo restrição calórica (RC) foi formulada a partir da referência de Genaro et al (2009), o qual sugere que a redução de 20 % a 30 % de calorias na dieta parece diminuir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Neste trabalho foi estabelecida uma restrição calórica de 30 % da dieta controle. A composição da ração foi a mesma utilizada no grupo controle, porém subtraída em 30 %.

3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1. CONSUMO ALIMENTAR

O consumo alimentar diário de um rato adulto é de 20 g a 40 g. Neste estudo a quantidade diária foi definida através de testes entre 20 g e 40 g. O valor estipulado foi aquele que não resultou em sobra de alimento. Este teste foi realizado para que a quantidade de alimento fornecida para o grupo RC fosse 30 % quando comparado ao grupo C. Desta forma, o grupo C e grupo *S. platensis* se alimentaram com 20 g/dia, já que o grupo RC se alimentou com 14 g/d.

3.4.2. CONTROLE DE PESO

Para as medidas de peso foi utilizada uma balança da marca Urano®. Durante o período experimental os animais foram pesados a cada sete dias.

3.4.3. SACRIFÍCIO

Depois de concluído o período experimental, de 20 semanas, os animais foram sacrificados por inalação de halotano, levando em consideração que a técnica de descarte não influenciou nos resultados. A coleta das amostras de sangue foi realizada antes do sacrifício.

3.4.4. ANÁLISES SÉRICAS

As análises séricas foram realizadas nos tempos zero (inicial), e no tempo final (120 d de intervenção). O sangue coletado foi utilizado para análise do perfil lipídico (Colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos), glicose e TBARS.

3.4.5. PROCEDIMENTO DO PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE

O sangue dos animais foi coletado pela técnica de punção da retro-orbital e após os olhos foram lavados com solução fisiológica. Foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue, em tubo heparinado e este foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 min em centrífuga refrigerada (CIENTEC®). O sangue coletado foi acondicionado em frascos com heparina devidamente identificados.

3.4.6. ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO (TBA)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBA foram quantificadas pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990).

Para tal, misturou-se 300 µL de plasma com 600 µL de TCA, 15 %. Após foi centrifugado (QUIMIS®) a 10.000 rpm por 10 mi. Em seguida foram retirados 500 µL do sobrenadente e colocado em um tubo com rosca. Após foi adicionado 500 µL de TBA (ácido tiobarbitúrico), 0,67 % e foi para o agitador (MARCONE®). Após, adicionado foi incubado em banho (MARCONE®) fervente por 20 min. Para finalizar foi deixado esfriar por 10 minutos em banho-maria com água em temperatura ambiente e na seqüência foi realizada a leitura no espectrofotômetro (SEMTO®) em 532 nm.

3.4.7. ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO

A fim de avaliar os parâmetros bioquímicos, aproximadamente 100 µL de plasma foram utilizados para cada análise. Para as análises do perfil lipídico (Colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos), foram utilizados os Kits da Bio Lab Test®, e as determinações foram realizadas de acordo com as orientações de uso e manejo de cada kit.

3.4.8. ANÁLISE DA GLICOSE

Para as dosagens da glicose foi utilizado o Kit Bio Lab Test®. As determinações seguiram as orientações da bula.

3.5. TRATAMENTOS DOS DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triacilgliceróis, glicose, TBARS e massa corporal foram avaliadas através de análise de variância e teste de Tukey para comparação de médias. Previamente as análises de variância foram realizados os testes de normalidade de dados e homogeneidade de variâncias. Os dados não normais foram submetidos a transformação de variáveis antes de serem tratados através da ANOVA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 4 apresenta os resultados das massas corporais (g) obtidas para os grupos experimentais.

Tabela 4 Valores das massas corporais (g) para os ratos submetidos aos tratamentos no tempo inicial (0 d) e em 120 d

TRATAMENTOS	MASSA (g) (0 d)	MASSA (g) (120 d)
Controle (C)	370,50±21,18 ^{ab}	455,60±28,84 ^c
<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	344,90±28,90 ^a	404,40±35,58 ^b
Restrição Calórica (RC)	357,20±51,48 ^a	347,40 ±26,80 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

* Resultados de média \pm desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) indicou que os fatores tempo e tratamento foram significativos ($p < 0,001$) sobre a resposta massa corporal.

Como a interação tempo e tratamento também foi significativa ($p = 0,001$), esta foi avaliada em detrimento dos fatores individuais.

A comparação de médias para os resultados de massa corporal em função do tempo de tratamento e dos grupos experimentais demonstrou que os ratos do grupo restrição calórica apresentaram valores de massa corporal iguais estatisticamente ($p = 0,986$, Tab. 4), aos do início do tratamento, ou seja, o grupo de cobaias que receberam o tratamento com restrição de calorias não aumentaram seu peso corporal. Já os ratos do grupo controle e do grupo *Spirulina* tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) (Figura 1). Na massa corporal obteve-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos C, Sp e RC no período pós tratamento.

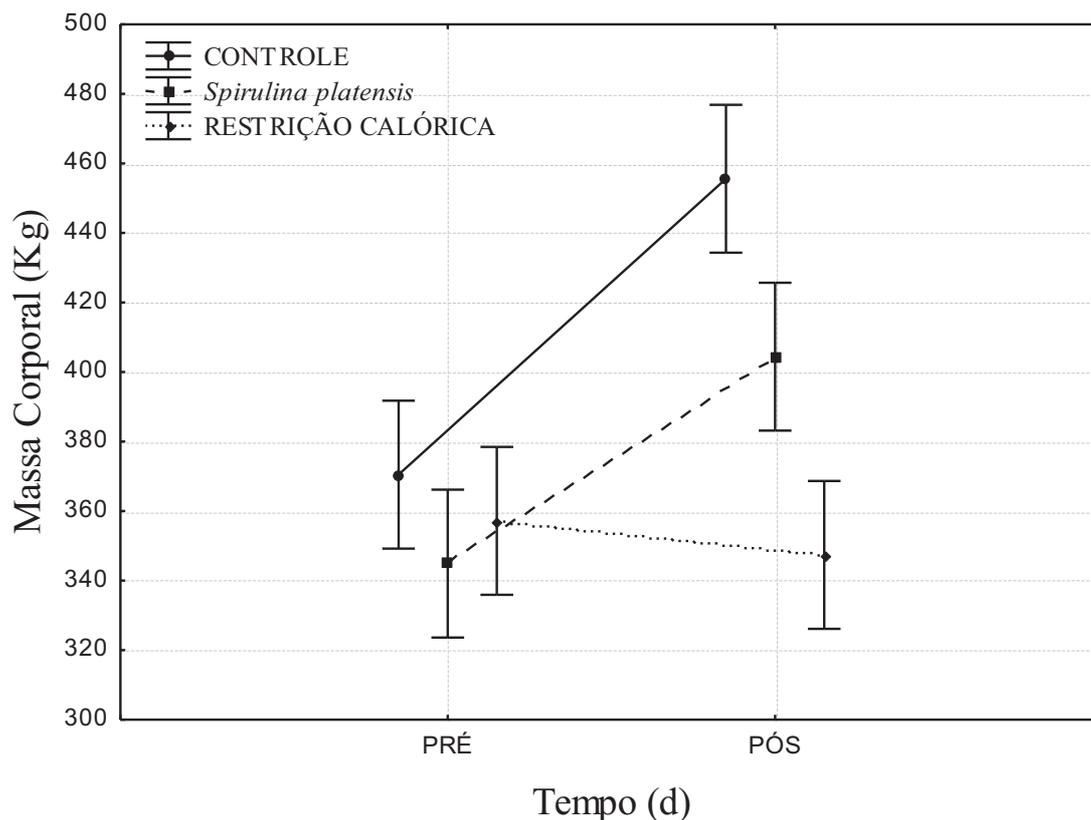


Figura 1 - Manutenção da massa corporal dos ratos do grupo RC em função do tempo

Segundo Hayflick durante o envelhecimento ocorrem variações de peso e mudanças metabólicas. No homem o peso aumentará até aproximadamente os 55 anos, após o mesmo começa a diminuir. A partir dos 30 anos o consumo anual de calorias pelo organismo diminuiu aproximadamente 12 calorias por dia. O peso diminuiu entre os 55 e 75 anos, devido principalmente a perda de tecido magro, massa muscular, água e massa óssea (HAYFLICK, 1997).

O modelo biológico utilizado neste estudo tem sua fisiologia parecida com a dos humanos, sendo que seu sistema nervoso é semelhante em até 90 % e seu tempo médio de vida é dois anos e meio. Lendo em conta que os ratos estudados tinham 6 meses de vida, ou seja, naquele momento tinham vivido menos de 1/3 de sua vida, sua tendência natural seria o ganho de peso.

O fato de os ratos estarem vivendo isolados em gaiolas individualizadas poderia contribuir para o ganho significativo de peso dos animais do grupo Controle e *Spirulina*, porém o grupo restrição calórica, ao contrário dos outros grupos, conseguiu manter o peso dos ratos avaliados.

O ganho de peso é considerado um dos fatores de risco para o aparecimento de diversas patologias. As complicações associadas ao ganho de peso tornam-se mais comuns e mais facilmente identificadas. A obesidade leva ao aparecimento de doenças como diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica e dislipidemia, que aumentam o risco de eventos cardiovasculares (PINHAS-HAMIEL, 1996). Contudo a associação entre obesidade e doença coronariana está bem estabelecida (GUH, 2009).

Levando em conta a importância da tentativa de encontrar possíveis explicações para o aumento da longevidade através da diminuição de patologias relacionadas com o ganho de peso, neste estudo os resultados demonstraram conseguir promover a manutenção do peso corporal no grupo de cobaias com o tratamento de restrição de calorias. Já o grupo tratado com *Spirulina* apresentou menor ganho de peso em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

A tabela 5 apresenta os resultados de triacilgliceróis (mg/dL) obtidos para os grupos experimentais. Para a realização da ANOVA os dados foram normalizados através da transformação $1/TGA$. Houve diferença significativa nos valores de TGA em função do tempo ($p = 0,0039$) e tratamento ($p < 0,001$). A interação dos fatores também foi significativa ($p = 0,045$) devendo ser analisada em função dos tratamentos individuais. As diferenças de médias apresentadas na Tabela 5 são relativas a estes dados transformados.

Tabela 5 Valores de triacilgliceróis (mg/ dL) para os ratos submetidos aos tratamentos no tempo inicial (0 d) e em 120 d

TRATAMENTOS	TGA(mg/dL)(0 d)	TGA(mg/dL) (120 d)
Controle (C)	69,43±15,12 ^a	134,29±35,28 ^c
<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	46,43±13,50 ^b	52,43 ± 10,33 ^{ab}
Restrição Calórica (RC)	74,00±14,28 ^a	73,71 ± 13,76 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

* Resultados de média ± desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de triacilgliceróis demonstrou diferença significativa entre os grupos comparando-se os tempos inicial e final de tratamento apenas no grupo controle ($p = 0,0039$).

A comparação de médias para os resultados de triacilgliceróis em função do tempo de tratamento e dos grupos experimentais demonstrou que os ratos do grupo controle tiveram um aumento (de 64,43 para 134,29mg/dL) significativo ($p < 0,05$, Tab. 5). Já os ratos que receberam a ração acrescida com *Spirulina platensis* e os que tiveram restrição de calorias não demonstraram nenhum ganho dos seus níveis de triacilgliceróis ($p > 0,05$) do período pré para o pós-tratamento (Figura 2).

Na comparação das médias entre os tratamentos, no período pós tratamento, houve diferença significativa ($p < 0,05$, Tabela 2) entre o grupo C e o grupo Sp como também entre o grupo C e o grupo RC, em ambos indicando os níveis de TGA do grupo C significativamente maiores (134,29mg/dL).

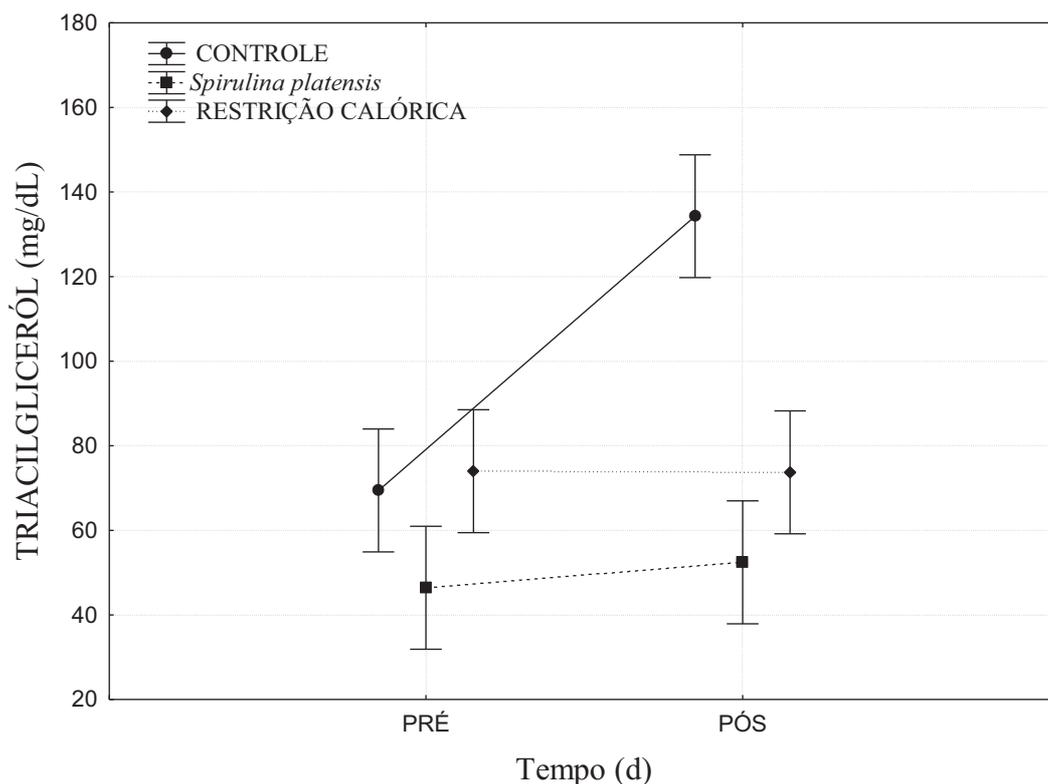


Figura 2 - Aumento significativo nos valores de TGA no grupo C.

Contudo, pôde-se observar que os animais que não receberam nenhum tratamento apresentaram níveis de triacilgliceróis significativamente maiores (Figura 2). Com o envelhecimento, a tendência nas concentrações sanguíneas de triacilgliceróis é aumentar. Neste caso, pode-se inferir que os tratamentos conseguiram manter, sem alterações significativas os níveis de triglicerídeos nestes grupos de ratos.

Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo feito com coelhos, onde a adição de 0,5g de *Spirulina* a uma dieta colesterolêmica não ocasionou decréscimo significativo nos níveis de triacilgliceróis (COLLA et al, 2008). Já, Almecí et al (2009) encontraram uma atividade hipotrigliceridemiante em estudo realizado com 30 ratos, durante 28 dias utilizando extrato hidroalcolico de *C. sylvestris* Sw, que constitui-se em um material

vegetal e cujos resultados foram atribuídos aos compostos fenólicos presentes no extrato hidroalcólico.

Na Tabela 6 estão elencados os resultados de colesterol HDL (mg/dL) obtidos para os grupos experimentais. Para a realização da ANOVA os dados foram normalizados através da transformação $1/\text{HDL}$. As diferenças de médias apresentadas na Tabela 6 são relativas a estes dados transformados.

Tabela 6 Valores de colesterol HDL (mg/dL) para os diferentes tratamentos no tempo inicial (0 d) e em 120 d

TRATAMENTOS	HDL(mg/dL)(0 d)	HDL(mg/dL) (120 d)
Controle (C)	22,57±5,50 ^b	38,14±13,02 ^a
<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	24,86 ±4,41 ^{ab}	48,14±22,39 ^a
Restrição Calórica (RC)	24,71±0,95 ^{ab}	39,5±13,92 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

* Resultados de média ± desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de colesterol HDL demonstrou um aumento significativo (de 22,57 para 38,14 mg/dL) (Figura 03) apenas no grupo controle comparando-se os tempos inicial e final de tratamento ($p < 0,05$, Tab. 6). A microalga *Spirulina platensis* e o grupo restrição calórica não se mostraram eficientes no aumento dos níveis de colesterol HDL. A comparação de médias para os resultados de colesterol HDL entre os grupos experimentais, no pós-tratamento não demonstrou diferença significativa ($p = 0,98$).

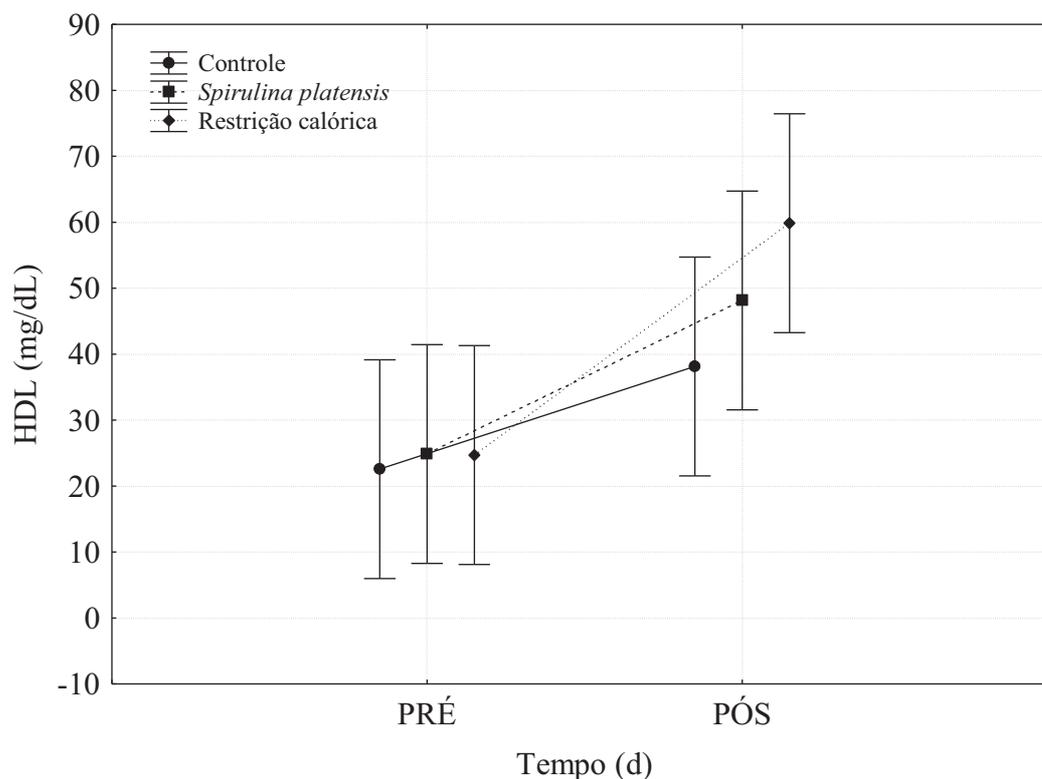


Figura 03 - Aumento significativo do colesterol HDL no grupo C.

Neste caso, os resultados obtidos com o uso da *Spirulina platensis* e da Restrição calórica, não demonstraram efeitos significativos comparados com o grupo controle, discordando da literatura atual onde os achados indicam efeitos positivos com o uso da microalga. O estudo de Colla et al. (2008) e Bertolin et al (2009) realizado com coelhos e ratos, respectivamente, em uma dieta adicionada de *Spirulina* se mostraram eficientes para o aumento nos níveis de colesterol HDL.

Com o avanço da idade ocorre um estreitamento da parede cardíaca e um aumentando da incidência de doença coronariana (HAYFLICK, 2007), como também ocorrem modificações na composição corporal, caracterizadas pelo aumento da gordura e pela diminuição da massa magra, onde a alimentação excessiva e com alta densidade energética

juntamente com um o estilo de vida sedentário resultam em ganho de peso, aumento da geração de radicais livres e de doenças crônicas (MARQUES et al, 2007).

Resultados semelhantes também foram encontrados em um estudo conduzidos em camundongos onde atestaram que a restrição calórica aumenta a longevidade impedindo ou retardando a ocorrência das doenças crônicas como: arteriosclerose, cardiomiopatia, diabetes, doenças autoimunes, câncer, Alzheimer e Parkinson (WANG, 2007). Os resultados de WEINDRUCH (2009) revelaram atenuação das alterações dependentes do envelhecimento no metabolismo de lipoproteínas e energia, assinalado pelo aumento relativo do HDL e redução dos níveis VLDL e maior sensibilidade a insulina através da restrição calórica.

Na Tabela 7 estão elencados os resultados de colesterol LDL (mg/dL) obtidos para os grupos experimentais. Para a realização da ANOVA os dados foram normalizados através da transformação $1/LDL$. As diferenças de médias apresentadas na Tabela 7 são relativas a estes dados transformados.

Tabela 7 Valores de colesterol LDL (mg/dL) para os diferentes tratamentos no tempo inicial (0 d) e em 120 d

TRATAMENTOS	LDL(mg/dL)(0 d)	LDL(mg/dL) (120 d)
Controle (C)	23,14±6,96 ^c	50,14±15,68 ^a
<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	38,43 ±6,90 ^{abc}	35,43±19,50 ^{abc}
Restrição Calórica (RC)	23,86±6,18 ^{bc}	44,57±14,82 ^{ab}

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

* Resultados de média ± desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de colesterol LDL em função do tempo e tratamento demonstrou diferença significativa ($p = 0,0075$) nos valores de LDL em

função do tempo. Como a interação tempo e tratamento também foi significativa ($p=0,0027$), esta foi avaliada em detrimento dos fatores individuais.

A comparação de médias para os resultados de colesterol LDL em função do tempo e tratamentos demonstrou que no tempo inicial, como também no tempo final, todos os ratos apresentaram valores iguais de LDL ($p>0,05$, Tabela 7). Já, os resultados de colesterol LDL dos ratos do grupo controle tiveram um aumento (de 23,14 para 50,14mg/dL) significativo ($p<0,05$, Tabela 7) (Figura 4) em relação ao tempo inicial, (23,14). Já os que receberam a ração acrescida com *Spirulina platensis* e os que tiveram restrição de calorias não demonstraram ganho ou diminuição significativo dos seus níveis de LDL ($p>0,05$) no período pré e pós-tratamento (Figura 4).

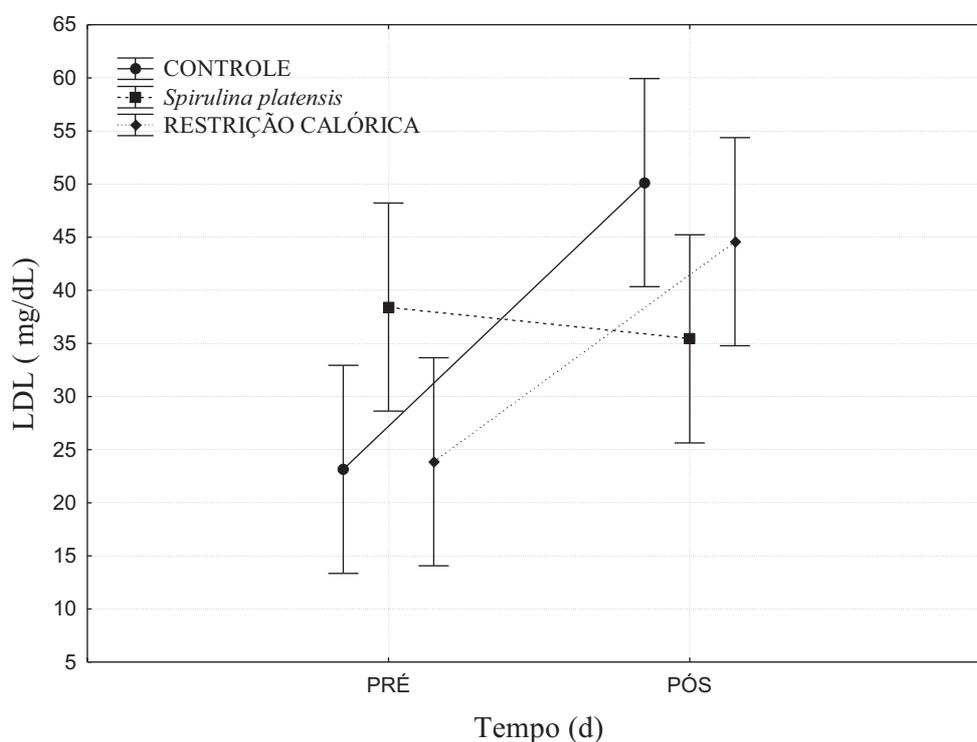


Figura 04 - Aumento significativo do colesterol LDL no grupo C.

A hipercolesterolemia é caracterizada por um aumento do colesterol total e LDL-colesterol no soro. Ela é geralmente reconhecida como um fator de risco de aterosclerose, estresse oxidativo e LDL modificado oxidativamente (ONDREJOVIČOVÁ, 2010). Com o envelhecimento, a tendência de acentuação nas concentrações sanguíneas de LDL tende a aumentar. Neste caso, pode-se inferir que os tratamentos conseguiram manter semelhantes aos valores do início do tratamento os níveis de colesterol LDL nestes grupos de ratos.

A alteração dos níveis de colesterol e triacilgliceróis plasmáticos podem resultar em dislipidemias e conduzir à ocorrência de doenças cardiovasculares, principalmente a aterosclerose. Estudos referentes ao potencial terapêutico da microalga *Spirulina platensis* sugerem sua utilização para a prevenção e diminuição dos danos causados pela hipercolesterolemia (COLLA et al, 2008; BERTOLIN et al, 2009) .

O desenvolvimento de terapias para tratamento das dislipidemias, particularmente a hipercolesterolemia, baseia-se em evidências que sugerem que a redução dos níveis séricos de colesterol é capaz de estabilizar placas ateroscleróticas e reduzir eventos cardiovasculares, incluindo mortalidade por todas as suas causas. (GÓIS et al, 2005). Experiências clínicas têm demonstrado o efeito de substâncias antioxidantes como às vitaminas E, C e o β -caroteno, sobre a evolução de lesões ateroscleróticas, sendo elas capazes de, *in vitro*, aumentar a resistência da LDL à oxidação. (PORTO, 2005).

Neste estudo, os índices de colesterol LDL, após 120 dias de tratamento, manteve iguais, levando em conta que o grupo sem nenhuma intervenção (grupo C), aumentam seus níveis de LDL, seguindo a tendência normal com o processo do envelhecimento.

Na Tabela 8 estão expostos os resultados de glicose (mg/dL) obtidos para os grupos experimentais.

Tabela 8 - Valores de glicose (mg/dL) para os diferentes tratamentos no tempo inicial (0 d) e em 120 d

TRATAMENTOS	GLICOSE (mg/dL)(0 d)	GLICOSE (mg/dL) (120 d)
Controle (C)	105,29±8,98 ^a	82,00±23,55 ^a
<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	96,57±17,05 ^a	98,29±24,42 ^a
Restrição Calórica (RC)	94,00±14,85 ^a	87,14±16,61 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

* Resultados de média \pm desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de glicose não demonstrou diferença significativa entre os grupos comparando-se os tempos inicial e final de tratamento ($p=0,61$).

O comportamento dos grupos frente aos tratamentos não demonstrou diferença significativa nos níveis de glicose antes e depois dos tratamentos em nenhum dos grupos como também não demonstrou resultados significativos entre os tratamentos.

Embora a literatura evidencie efeitos positivos com o uso dos tratamentos feitos neste estudo, em nosso experimento não foram obtidos resultados significativos.

O Diabetes mellitus é um distúrbio crônico, caracterizado pelo comprometimento do metabolismo da glicose e de outras substâncias produtoras de energia. Entre os antioxidantes que têm recebido maior atenção, por sua possível ação benéfica na glicemia e prevenção da doença aterosclerótica, estão as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), os carotenóides e os flavonóides (RODRIGUES et al, 2003). Dentre os constituintes da microalga *Spirulina* destacam-se as proteínas de alta qualidade, minerais, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados e pigmentos antioxidantes. A vitamina E é a principal vitamina antioxidante transportada na

corrente sanguínea pela fase lipídica das partículas lipoprotéicas. Junto com o beta-caroteno e outros antioxidantes naturais, chamados ubiquinonas, a vitamina E protege os lipídios da peroxidação. (SOUZA, et al, 2003). A *Spirulina* também mostrou um efeito favorável no perfil lipídico, capacidade antioxidante, e resposta inflamatória em pacientes coreanos com diabetes do tipo 2 (LEE, 2008).

Masoro (1997) explica que embora os animais com restrição de calorias e sem restrição de calorias queimem a mesma quantidade de glicose por grama de tecido, a concentração de glicose na corrente sanguínea dos animais em dieta de restrição de calorias é muito menor. Ele acredita que essa menor quantidade de glicose na corrente sanguínea é benéfica, pois alguns dos produtos do metabolismo da glicose interagem com importantes enzimas, proteínas e até com DNA dos genes danificando-os ou desativando-os (MASORO apud HAYFLICK, 1997).

Contudo, neste estudo a microalga *Spirulina* não promoveu efeitos no grupo de ratos estudados, bem como a RC não produziu nenhum efeito significativo nos níveis de glicose.

Na Tabela 9 estão elencados os resultados de colesterol total (mg/dL) obtidos para os grupos experimentais. Para a realização da ANOVA os dados foram normalizados através da transformação log CT. As diferenças de médias apresentadas na Tabela 9 são relativas a estes dados transformados.

Tabela 9 Valores do colesterol total (mg/dL) para os diferentes tratamentos no tempo inicial (0 d) e em 120 d

TRATAMENTOS	CT (mg/dL)(0 d)	CT (mg/dL) (120 d)
Controle (C)	51,33±6,95 ^a	16,22 ±4,29 ^c
<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	58,71±14,21 ^a	13,60±1,96 ^{bc}
Restrição Calórica (RC)	53,26±6,27 ^a	11,30±2,87 ^b

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

* Resultados de média \pm desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de colesterol total demonstrou diferença significativa em função do tempo ($p < 0,001$) e tratamento ($p = 0,035$) comparando-se os tempos inicial e final de tratamento ($p < 0,035$). Como a interação tempo e tratamento também foi significativa ($p = 0,013$), esta foi avaliada em detrimento dos fatores individuais.

A comparação de médias para os resultados de colesterol total em função do tempo de tratamento e dos grupos experimentais demonstrou que no tempo inicial todos os ratos apresentaram valores iguais estatisticamente ($p > 0,05$, Tab. 9). O grupo RC apresentou o colesterol significativamente ($p < 0,05$) inferior (11,30 ml/dL) que os ratos do grupo controle (16,22 ml/dL) (Figura 05). Os resultados de colesterol total dos ratos do grupo *Spirulina* foram iguais estatisticamente aos resultados dos demais grupos.

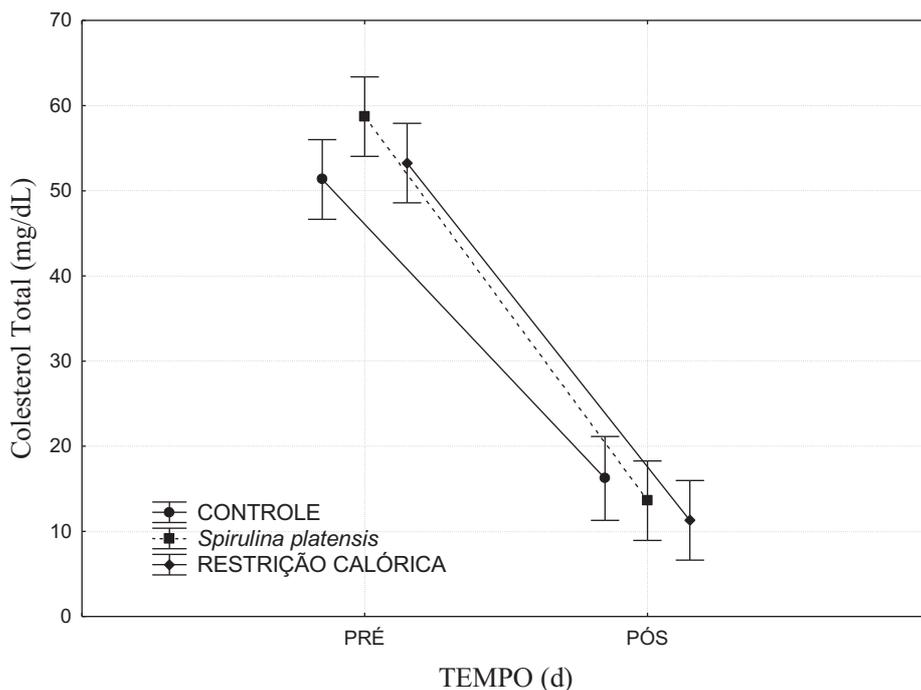


Figura 05 - Redução significativa na comparação entre os tratamentos do colesterol total no grupo RC.

Neste caso, o grupo *Spirulina platensis* não demonstrou diferença significativa comparado ao grupo controle. A literatura obteve resultados mais positivos em relação aos níveis de colesterol total com o uso da *Spirulina*. Por exemplo, Nagaoka *et al.* (2005) em um estudo sobre a ação hipocolesterolêmica da *Spirulina platensis* em ratos, demonstrou que a proteína ficocianina derivada da *Spirulina platensis* influencia a concentração de colesterol sérico conferindo uma atividade atenuadora nos valores de colesterol em ratos.

Neste estudo, a restrição calórica mostrou-se efetiva na redução do colesterol total em comparação ao grupo controle (Tabela 9). Levando em conta que o acúmulo de danos oxidativos em macromoléculas tem sido considerado como causador de dano celular e patologias como as dislipidemias, por exemplo, os resultados demonstrados contribuem com a hipótese de uma ação protetora para o organismo com uso da restrição de calorias.

Também foi evidenciado no estudo de Ngozi que a restrição calórica atenua o dano oxidativo e a dislipidemia exacerbada durante a diabetes pela redução significativa no seu peso corporal, e níveis de colesterol total (NGOZI, 2007).

A tabela 10 apresenta os resultados de TBA (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) encontrados para os grupos experimentais.

Tabela 10 Valores de TBA (nmol) para os ratos submetidos aos tratamentos no tempo inicial (0 d) e em 120 d

TRATAMENTOS	TBA (nmol) (0 d)	TBA (nmol) (120 d)
Controle (C)	0,026±0,001 ^a	0,023±0,0203 ^b
<i>Spirulina platensis</i> (Sp)	0,027±0,001 ^a	0,011±0,002 ^c
Restrição Calórica (RC)	0,025±0,001 ^a	0,010±0,001 ^c

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

* Resultados de média ± desvio padrão.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de TBA demonstrou diferença significativa nos valores de TBA em função do tempo ($p < 0,001$) e tratamento ($p < 0,001$, Figura 06). Como a interação tempo e tratamento também foi significativa ($p < 0,001$), esta foi avaliada em detrimento dos fatores individuais.

A comparação de médias para os resultados de TBA em função do tempo de tratamento e dos grupos experimentais demonstrou que os grupos *Spirulina* e restrição calórica mostraram diferença significativa comparados com o grupo controle ($p < 0,001$) (Tabela 10).

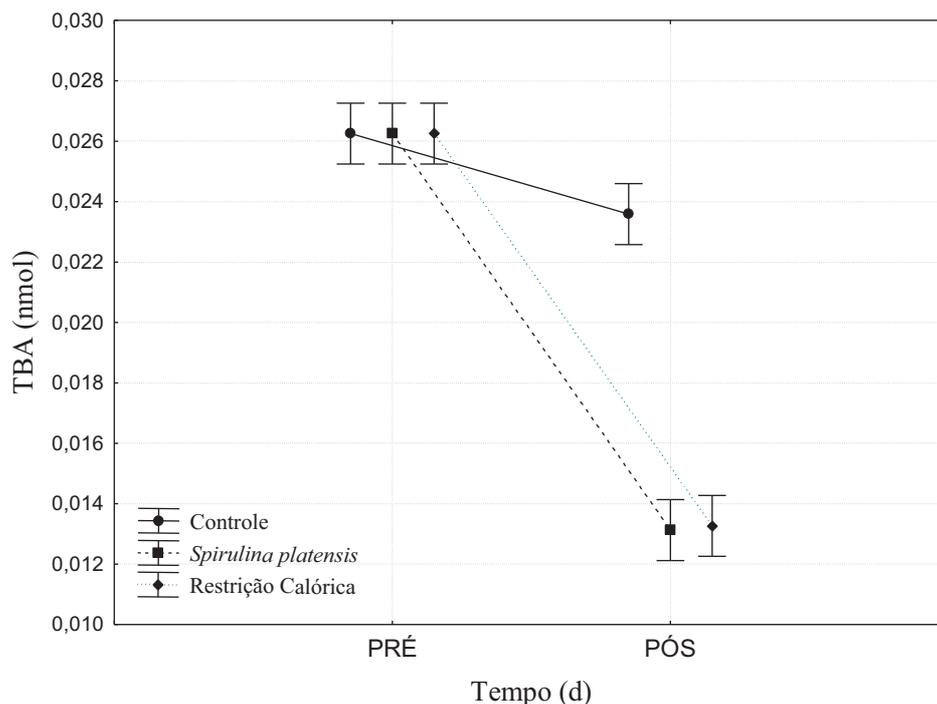


Figura 06- Diminuição nos níveis de TBA nos grupos RC e Sp.

A quantificação das TBARS avalia a presença de peroxidação lipídica, através dos níveis de MDA, os quais servem como marcadores de estresse oxidativo (POTTER, NEUN; STERN, 2011; GUSTAW-ROTHENBERG; KOWALCZUK; STRYJECKA-ZIMMER, 2010), em função disso este estudo buscou analisar esse marcador que possui importante relação com as doenças crônicas e com o envelhecimento.

Os resultados do nosso estudo demonstraram que houve uma ação protetora com o uso da *Spirulina* como também da restrição calórica nos ratos avaliados, corroborando com resultados diversos, onde registram que compostos fenólicos podem não só aumentar a sustentação alimentar, mas também atuar como antioxidantes em muitos sistemas biológicos reduzindo a incidência de doenças (MILIE et al, 1998, BELAY, 2002). Resultados semelhantes foram encontrados recentemente em revisões que analisaram o impacto dos

antioxidantes sobre a teoria do estresse oxidativo (KUA CHONG-HAN, 2010; GIL DEL VALLE, 2010; RAFFAELLO, RIZZUTO, 2010).

No estudo de Souza et al (2006), por exemplo, o pigmento ficocianina apresentou potencial antioxidante frente a peroxidação lipídica no óleo de soja e azeite de oliva, podendo minimizar danos celulares e inibir a formação de radicais livres. Resultados semelhantes também foram obtidos, em um estudo feito com ratos, utilizando suplementação dietética de azeite extra-virgem, onde o mesmo neutralizou o efeito do dano de um pesticida utilizado no estudo. Estes efeitos ocorreram pelo reforço da defesa do sistema antioxidante e a diminuição da peroxidação lipídica (NAKBI, 2010).

Em relação à restrição calórica, as evidências bibliográficas vêm demonstrando efeitos semelhantes aos encontrados neste estudo. Acumulação de dano oxidativo induzido pela idade e outras mudanças podem ser atenuadas por um longo prazo de regime de restrição calórica. Tais regimes tipicamente envolvem a redução da ingestão de uma dieta nutritiva por 20-50% abaixo dos níveis ad libitum (HUNT et al, 2006).

Feurs (1998) mostrou que camundongos submetidos à alimentação com farta disponibilidade de calorias, têm sua vida diminuída, quando comparados com camundongos alimentados com dieta contendo 30% menos calorias que o usual. O autor relata que a restrição calórica tem efeito sob a diminuição na taxa de metabolismo basal, resultando num aumento da longevidade pela preservação da atividade respiratória da mitocôndria.

Barja e seus colaboradores evidenciaram que uma restrição calórica de 40% conduz a uma diminuição em 47% da taxa de produção mitocondrial de H₂O₂ e 46% para uma diminuição do dano oxidativo ao DNA mitocondrial (2002).

O uso da RC como hipótese de diminuir o fluxo de elétrons mitocondrial e vazamentos de prótons para atenuar os danos causados por espécies reativas de oxigênio (HUNT et al, 2005; RAFFAELLO E RIZZUTO , 2010) vem contribuir com os resultados encontrados neste estudo.

5. CONCLUSÕES

Os resultados de efeitos benéficos nos níveis de TGA, colesterol LDL, lipoperoxidação lipídica (TBARS) e manutenção do peso pelo uso da *Spirulina platensis* no processo de envelhecimento de ratos parece indicar que esta cianobactéria pode ser utilizada como um funcional mimetizador da restrição calórica.

As implicações do uso da *Spirulina platensis* e restrição calórica encontrados neste estudo corroboram com as evidências destas terapias em favor da longevidade.

REFERÊNCIAS

- BABUSIKOVA, E. Age-related oxidative modifications of proteins and lipids in rat brain. *Neurochemical Research*, v.32, n.8, p. 1351-1356, 2007.
- BAST, A. Oxidants and antioxidants: state of the art. *American Journal of Medicine*, v.91, p. 2-13, 1991.
- BERNHARDI, M.R. Envejecimiento: Cambios Bioquímicos y Funcionales del Sistema Nervioso Central. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatría*, v. 43, n.4, p. 297-304, 2005.
- BERTOLIN, T.E; PILATTI, D.; GIACOMINI, A.C.V BAVARESCO, C.S. ; COLLA, L.M; COSTA, J.A.V. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. *Brazilian archives of biology and technology*, v. 52, n.5, p. 1253-1259, 2009.
- BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M.; GIACOMINI, A.C.V; COSTA, J.A.C. Restrição Calórica e Envelhecimento. *Revista Envelhecimento Humano: Múltiplas Abordagens*. Passo Fundo. Universidade de Passo Fundo, 2008.
- BERTOLIN, T. E. ; GUARIENTI, C.; COSTA, J. A. V. Capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas ao estressor paraquat. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* (Impresso), v. 69, p. 56-62, 2010.
- BHAT, V.B.; MADYASTHA, K.M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 285, n. 2, p. 262-266, 2001.
- BORDONE, L; GUARENTE, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Revista Nature Mol Cell Biology*, v. 6,n. 4, p. 298-305; 2005.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VII *Lista dos novos ingredientes aprovados* – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais

e Novos Alimentos. Disponível em URL:
http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm, 2008.

CAMARANO, A.A.; KANSO, S.; MELLO, J.L. *Como vive o idoso brasileiro?* In: Camarano, A. A. (Org.). *Os novos idosos brasileiros muito além dos 60?* Rio de Janeiro: Ipea. p. 25-73, 2004.

CELMO, C. *Doenças do Coração: Prevenção e Tratamento*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CHAMORRO, G., SALAZAR, M., ARAUJO, K.G., DOS SANTOS C.P., CEBALLOS, G., AND CASTILLO, L.F. "Update on the pharmacology of *Spirulina* (Arthrospira), an unconventional food." *Arch Latinoam Nutr.*, v.52,n.3, p. 232-40, 2002.

CHEN, J; HALES, N; OZANNE S. E. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Research*, v. 35, 2007.

COLMAN, R. J. et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, v. 325, n. 5937, p. 201-204, 2009.

COLLA, L.M; MUCCILLO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.51, n.2, p.405-11, 2008.

CONTRERAS, A; HERBERT, D. C.; GRUBBS, B. G.; CAMERON, I. L. Blue-green alga, spirulina, as the sole dietary source of protein in sexually maturing rats. *Nutrition Reports International*, v. 19, p. 749-63, 1979.

CORRÊA, M. C. *Avaliação de indicadores do estresse oxidativo e da atividade da enzima acetilcolinesterase sanguínea em pacientes com diagnóstico de Acidente Vascular Cerebral Isquêmico*. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D; KABKE, K.;WEBER Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 603-607, 2002.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*, Washington, v. 82, p. 47-95, 2002.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*,v. 56, p. 497-500, 2001.

EVANS, C., et al. NAD⁺ metabolite levels as a function of vitamins and calorie restriction: evidence for different mechanisms of longevity. *BMC Chemical Biology*, v. 10, n. 2, 2010.

FARINATTI, P.T.V. Biological theories of aging: genetic and stochastic approaches. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.8, n.4, Niterói, July/Aug, 2002.

FERREIRA A. L. A; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP. *Revista Ass Medica Brasileira*, v. 43, n.1p. 61-8,1997.

FEUERS, R. The effect of dietary restriction on mitochondrial function in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 854, p.192-201, 1998.

FIGUEIREDO, A. R.; CLAIR A; REIS, E.M. Caracterização do perfil lipídico das amostras analisadas no laboratório central do Hospital Municipal Vereador Hugo Braga em piabetá, magé – *Revista Saúde e Ambiente*, v. 5, n. 1, 2010.

FINKEL, T; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, n. 9, 2000.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. Extending Healthy Life Span - From Yeast to Humans. *Science*, v. 328, n. 16, 2010.

GAW, A. *Bioquímica Clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001.

GENARO, P. S.; SARKIS, K. S; MARTINI, L. A. O efeito da restrição calórica na longevidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 5, 2009.

GIL DEL VALLE L. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomed Pharmacothe*, Sep 25, 2010.

GÓIS, A. F.; LOPES, T.; MOREIRA; N. H.; HUEB, WHADY, A. In: PORTO, GUH DP, ZHANG W, BANSBACK N, AMARSI Z, BIRMINGHAM CL, ANIS AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, v. 9, n.88, 2009.

GÓMEZ- PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nature*, v 9, p. 568-578, 2008.

GONZALEZ, F. H. D; SANTOS, A.P. Anais do 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, realizada em Porto Alegre: UFRGS, 2005.

GRINSTEAD, G. S. et al. Effects of *Spirulina plantensis* on growth performance of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, v. 83, p. 237-47, 2000.

GROW, A. J.; Ischiropoulos. H. J.; *J. Cell. Physiol*, 187, 277, 2001.

GUERRA, E.J.I.; *Anales Medicina Interna*, v.18, n.326, 2001.

GUSTAW-ROTHENBERG, K.; KOWALCZUK, K.; STRYJECKA-ZIMMER, M. Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Geriatric & Gerontology International*, v. 10, n. 2, p. 161-166, 2010.

HAYLLICK, L. *Como e por que envelhecemos*. Rio de Janeiro: Campus, 1997.

HARMAN, D. The aging process. *Medical Science*, v. 78, n. 11, p. 7124-7128, 1981.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, v. 11, n. 3, p. 298-300, 1956.

HARRIS, E. Regulations of antioxidant enzymes. *Journal FASEB*, v. 6, p. 2675-2683, 1992.

HENRIKSON, R. *Microalga Spirulina: superalimento del futuro*. Barcelona: Ediciones Urano S.A., 1994.

HUNT, D.N; LÓPEZ-LLUCH, G.; JONES, B.; ZHU, M.; JAMIESON, H.; HILMER, S.; CASCAJO, M.V.; ALLARD, J; INGRAM, D.K.; NAVAS, P.; CABO, R. Bioenergetics of aging and calorie restriction ageing. *Research Reviews*, v. 5, p.125–143, 2006.

KHAN, M. et al. Protective effect of Spirulina against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research*, v. 19, n. 12, p. 1030-1037, 2005.

KOUBOVA, J.; GUARENTE, L. How does calorie restriction work? *Gen Dev*, v. 17, n. 3, p.313-21, 2003.

KUA, C. H. Dietary Lipophilic Antioxidants: Implications and Significance in the Aging Process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 50, n. 10, p. 931 – 937, 2010.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C.M. Zinc, oxidative stress and physical activity. *Rev. Nutrition.*, vol.16, no.4, p.433-441, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. *Princípios de Bioquímica*. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEE, E. H.; PARK, J; CHOI Y; HUH, K; KIM, W. A randomized study to establish the effects of *spirulina* in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr Res Pract*. v.2, n. 4, p. 295–300, 2008.

LJUBUNCIC, P; REZNICK, A.Z. Evolução das Teorias do Envelhecimento-uma mini-revisão. *Gerontology*, v. 55, p.205-216, 2009.

MANUAL para técnicos em animais de laboratório: capacitação de pessoal de níveis elementar e médio em biotérios - CPNEMB. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz/CICT, p.132, 1994.

MARQUES, A. P. O; ARRUDA, I. K. G.; LEAL M. C. C.; SANTO A. C. G. Envelhecimento, obesidade e consumo alimentar em idosos. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia* v.10 n.2 Rio de Janeiro 2007.

MASORO, E. J. Dietary restriction: current status. *Aging* (Milano), v. 13, 261-262, 2001.

_____ Caloric Restriction: A Key to Understanding and Modulating Aging. *Amsterdam: Elsevier*; p. 1021-1023, 2002.

MATÉS, J. M; PÉREZ-GÓMEZ, C; CASTRO, I. N. Antioxidant Enzymes and Human Disease. *Clinical Biochemistry*, v. 32, p. 85-94,1994.

MILIÉ, B. L.; DJILAS, S. M.; CANADAVNOVIÉ-BRUNET, J. M., Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. *Food Chemistry*, v.61, p.443-447,1998.

MORAES, F; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 2, p. 109-22, 2006.

MOREIRA A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17 ,n. 4,p. 411-424,2004.

MOTA, J. ; FIGUEIREDO, P. A.; DUARTE, J. A. Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, v.4, n. 1, p.81-110, 2004.

MURRAY, R.K; RODWELL, V.W. Harper: *Bioquímica*. 9. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

NAGAOKA, S., SHIMIZU, K., KANEKO, H., SHIBAYAMA, F., MORIKAWA, K., KANAMARU, Y., OTSUKA, A., HIRAHASHI, T., KATO, T. A novel protein C-

phycocyani plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of Spirulina platensis concentrate in rats. *Jornal Nutrição*, v. 135, p. 2425-2430, 2005.

NAKBI, A; TAYEB, W; DABBOU, S.; ISSAOUI M; GRISSA A. K; ATTIA, N; HAMMAMI, M. Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-Dexposed rats. *Lipids in Health and Disease*, v. 9n. 89, 2010.

NGOZI, H. Attenuation of plasma dyslipidemia and oxidative damage by dietary caloric restriction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 169 32–41, 2007.

KALACHE, A. Fórum. Envelhecimento populacional e as informações de saúde do PNAD: demandas e desafios contemporâneos. *Posfácio Caderno Saúde Pública*, v.23 n.10, Rio de Janeiro Oct. 2007.

OKABE, T.A. et al. Swimming reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice by antioxidant effects. *Cardiovascular Research*, v. 74, n.3, p. 537-545, 2007.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. Porto Alegre: Artmed, p. 33-49, 2005.

OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, v. 28, n. 4, p.655-663, 2005.

PAPALÉO, N; MATEUS, B, FRANCISCO, C. *Urgências em geriatria: epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico, conduta terapêutica*. São Paulo: Atheneu, p..476, 2001.

PARSONS, P.A. From the stress theory of aging to energetic and evolutionary expectations for longevity. *Biogerontology*, v. 4, p.63-73, 2003.

PINHAS-HAMIEL O, DOLAN LM, DANIELS SR, STANDIFORD D, KHOURY PR, ZEITLER P. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *Journal Pediatrics*, v.128, p. 608-15, 1996

PORTO, C.C. *Doenças do Coração: Prevenção e Tratamento*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

POTTER, T.M.; NEUN, B.W.; STERN, S.T. Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles. *Methods in Molecular Biology*, v. 697, n. 181-189, 2011.

RACETTE, S. B; WEISS, E. P; VILLAREAL, D. T; ARIF, H; STEGER-MAY, K; SCHECHTMAN, K. B; FONTANA, L; KLEIN, S; HOLLOSZY, J .O One year of caloric restriction in humans: feasibility and effects on body composition and abdominal adipose tissue. *Journal of Gerontology: Biological Sciences*, v. 61, n. 9, p. 943-50, 2006.

RAFFAELLO, A, RIZZUTO, R. Mitochondrial longevity pathways. *Biochimic Biophys Acta*. Jan, v. 1813, n. 1, p. 260-8, 2011.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLE, E.A.G. *Química de Alimentos*. São Paulo: editora Edgard Blucher, p. 184, 2004.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S; FAINE, L.A; ALMEIDA, J.A; FERNANDES, A.A. H; RIBEIRO, E.P.; SERAVALLE, E.A.G. *Química de Alimentos*. São Paulo: editora Edgard Blucher, 2004.

ROTH, G. S.; INGRAM, D. K, LANE M. A. Caloric restriction in primates and relevance to humans. *Ann N Y Academic Science*, v. 928, p.305-15; 2001.

SÁINZ, N. et al. Leptin administration downregulates the increased expression levels of genes related to oxidative stress and inflammation in the skeletal muscle of ob/ob mice. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, p. 1-15, 2010.

SALLY, C.; FAULKS, S. C.; TURNER, N.; ELSE, L.; HULBERT, A. J. Calorie Restriction in Mice: Effects on Body Composition, Daily Activity, Metabolic Rate, Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production, and Membrane Fatty Acid Composition. *Journal of Gerontology: biological sciences*, v. 61, n. 8, p. 781–794, 2006.

SCHAFFER, F. E. J. In: GOLDMAN, L; BRAUWALD, E. Free Radical Biol. *Medicine*, 2001.

SELIGMAN, K. CR for fountain of youth? *San Francisco Chronicle*. Sept. 2, 2007.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 20, n. 1, 1999.

SMITH, D. L.; CHONGHUA, L. I.; MATECIC, M; MAQANI, N; BRYK, M; SMITH, J. S. Calorie restriction effects on silencing and recombination at the yeast. *Aging Cell*, v. 8, p. 633–642, 2009.

SOARES, J. C. M; FOLMER, V; ROCHA, J. B. T.; Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol- containing enzymes in mice. *Nutrition*, 19, p. 627-632, 2002.

SOHAL, R. S. Oxidative stress hypothesis of aging. Serial Review: Oxidative stress and aging. *Free Radic. Biology and Medicine*, v. 33, p. 573–574, 2002.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, 273, p. 59–63, 1996.

SOUZA F. T.; MARGARITES A. C; COLLA L. M; COSTA J. A.V; BERTOLIN T. E. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara , v.17, n.3, p.287-291, jan./mar, 2006.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SQUIER, T. C. Estresse Oxidativo e agregação de proteína durante o envelhecimento biológico *Gerontologia Experimental*, v. 36, p. 1539- 1550, 2001.

STAMLER, J. S.; SLIKVA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Reviews*, v.54, p.1-30,1996.

SU-JU LIN; KAEBERLEIN, M.; ALEX, A.; ANDALIS; LORI, A.; STURTZ; DEFOSSEZ, P. A; VALERIA, C; CULOTTA; GERALD, R.; FINK; GUARENTE L. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature*,v. 418, p.344-348, 2002.

TORRES-DURAN, P.V; MIRANDA-ZAMORA, R.; PAREDES-CARBAJAL, M.C.; MASHER, D.; BLÉ-CASTILLO, J.; DÍAZ- ZAGOYA, J.C.; JUÁREZ-OROPEZA, M.A. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of Mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Diseases*; v. 6, n. 33, 2007.

TRANQUILLE, N; EMEIS J. J; DE CHAMBURE, D.; BINOT R, TAMPONNET, C. *Spirulina* acceptability trials in rats. A study for the “Melissa” life-support system. *Advances in Space Research*; v. 14, p. 167-70, 1994.

VOLLAARD, N. B.; SHEARMAN, J.P.; COOPER, C.E. Exercise-induced oxidative stress:myths, realities and physiological relevance. *Sports Medicine*, v.35, p.1045-62, 2005.

WANG, Z; MASTERNAK, M. M, AL-REGAIEY, K. A.; BARTKE, A. Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. *Endocrinology*, v. 148, n. 6, p. 2845-53, 2007.

WEINDRUCH R, WALFORD, R. *The retardation of aging and disease by dietary restriction*. Springfield: Thomas, 1988.

Yu, B.P. Why calorie restriction would work for human longevity. *Biogerontology*, v. 27, n. 3, p. 179-82, 2006.

ZOPPI, C.C et al. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Revista Paulista de Educação Física*, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 119-30, jul./dez, 2003. Disponível em: www.ibge.gov.br/ibgeteen/datas/populacao/home.html. Acessado em 21/01/2010.

ANEXO



**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa – UPF, em reunião no dia 12/05/09, analisou o projeto de pesquisa “**Restrição calórica e *Spirulina platensis* no processo do envelhecimento**”, registro no CEP 081/2009, de responsabilidade da pesquisadora **Telma Elita Bertolin**.

O projeto tem como objetivo verificar o potencial da microalga *Spirulina platensis* e da restrição calórica no estresse oxidativo no processo do envelhecimento de camundongos. Para isto a pesquisadora fará um estudo experimental envolvendo 30 camundongos Swiss machos. Os animais serão divididos em 3 grupos experimentais. Um grupo controle com dieta padrão para roedores, um grupo com dieta acrescida de *S. platensis* e um grupo com dieta de restrição calórica. Os animais serão pesados semanalmente. Após o experimento, os animais serão sacrificados por decapitação para análise dos parâmetros séricos e do estresse oxidativo.

Em relação aos aspectos éticos, a pesquisadora e seus colaboradores estão comprometidos com a observância dos “*Princípios Éticos na Experimentação Animal*” preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas em seu Regimento Interno, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

A pesquisadora deverá apresentar relatório a este CEP ao final do estudo.

Situação: PROTOCOLO APROVADO

Passo Fundo, 5 de junho de 2009.