

PARTICULARITĂȚILE MANIFESTĂRII STRESULUI OXIDATIV INDUS DE CUPRU (II) LA *SPIRULINA PLATENSIS*

Doctor în biologie, conferențiar cercetător **Liliana CEPOI**
Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM

PECULIARITIES OF CU(II) INDUCED OXIDATIVE STRESS IN *SPIRULINA PLATENSIS*

Summary. The purpose of this research paper was to highlight the changes in the biochemical parameters of spirulina biomass under copper sulfate induced oxidative stress. The correlation between these parameters and the level of oxidative stress marker – malondialdehyde was evaluated, as well. The oxidative stress, induced by 5 mg / l copper sulphate (II), has been confirmed in *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 by the decreased amount of biomass and its antioxidant activity, increased total lipid and malondialdehyde content, as well as by significant changes in protein and carotenoid content. Negative correlations (r from -0.892 to -0.756) have been established between the values of the oxidative stress marker - malondialdehyde and the protein, lipid and carotenoid content under oxidative stress. The values obtained using the ABTS assay closely correlated with the values of ferric reducing antioxidant power assay. Both methods are appropriate for assessing the antioxidant activity of spirulina biomass under induced oxidative stress.

Keywords: *Spirulina platensis*, oxidative stress, Copper, malondialdehyde, ABTS test, Ferric reducing antioxidant power test, correlation.

Rezumat. Scopul cercetărilor reflectate în acest articol a constat în evidențierea modificării parametrilor biochimici ai biomasei de spirulină în condiții de stres oxidativ, indus de sulfatul de cupru, și a nivelului de corelare a valorilor parametrilor biochimici cu cele ale markerului stresului oxidativ – dialdehida malonică. Sulfatul de cupru (II) în cantitate de 5 mg/l produce o stare de stres oxidativ în cultura de *Spirulina platensis* CNMN-CB-11, confirmat prin reducerea cantității de biomasă și a activității ei antioxidante, creșterea conținutului de lipide totale și de dialdehidă malonică, precum și prin modificări semnificative ale conținutului de proteine și carotenoizi. Între valorile obținute pentru markerul stresului oxidativ – dialdehida malonică – și conținutul de proteine, lipide și carotenoizi au fost stabilite corelări inverse (coeficientul de corelare având valori de la -0,892 până la -0,756) în condiții de stres oxidativ provocat de prezența ionilor. Valorile testului de reducere a radicalului cation ABTS și a celui de determinare a puterii de reducere a fierului corelează strâns, fiind ambele adecvate pentru evaluarea activității antioxidante a biomasei de spirulină în condiții de stres oxidativ indus.

Cuvinte-cheie: *Spirulina platensis*, stres oxidativ, cupru, dialdehida malonică, Test ABTS, Test de determinare a puterii de reducere a fierului, corelare.

INTRODUCERE

Metalele grele, în funcție de gradul lor de oxidare, pot fi foarte reactive, iar în consecință, extrem de toxice pentru organismele vii. Efectul toxic este asociat cu producerea de specii reactive de oxigen (SRO) și cu statutul redox celular dezechilibrat. Cianobacteriile, în general, și spirulina, în particular, răspund la acțiunea metalelor grele prin inducerea sintezei accelerate a mai multor antioxidanți, incluzând diverse enzime cum ar fi superoxid dismutază, catalază, peroxidazele. De asemenea, în condiții de stres oxidativ are loc intensificarea sintezei compușilor antioxidanți cu masă moleculară mică, cum ar fi carotenoizii, glutatationul, tocoferolul ș.a. Cianobacteriile posedă o mare varietate de carotenoizi ca mixoxantofila, β -carotenul și derivații săi (zeaxantina, echinenonă). Acești pigmenți disociază energia din clorofila fotosensibilizată sau din oxigenul singlet, iar mai multe studii au evidențiat proprietățile lor antioxidante [1, pp. 1153-1165].

La concentrații moderate de poluanți metalici sistemele celulare susnumite reușesc să readucă raportul SRO-antioxidanți la starea de echilibru, asigurând supraviețuirea celulelor. În condițiile cantităților ridicate sau acute ale metalelor grele, se produce deteriorarea celulelor, deoarece nivelurile SRO depășesc capacitatea antioxidantă a sistemelor de protecție [2, pp. 36-46].

Printre metalele de tranziție un impact mai pronunțat asupra sistemului redox celular îl au fierul și cuprul. Aceste metale sunt implicate în ciclul Haber-Weiss, în urma căruia din oxigenul molecular și peroxidul de hidrogen se produce radicalul hidroxil ($\cdot\text{OH}$), cel mai periculos dintre radicalii liberi pentru organismele vii. În special, acest lucru se referă la formele ionice ale metalului.

Este cunoscut efectul nociv al ionilor de cupru asupra microalgelor și cianobacteriilor. De exemplu, sulfatul de cupru este utilizat cu succes în calitate de algicid în combaterea fenomenului de înflorire a apelor. CuSO_4 blochează lanțul de transport al electro-

nilor, accentuează semnificativ acumularea de specii reactive de oxigen (ROS) și dereglează funcționalitatea sistemului antioxidant. Creșterea cantității de SRO dereglează sinteza pigmentilor și distruge integritatea membranei celulare, ceea ce provoacă moartea celulelor algelor și cianobacteriilor [3, pp. 871-886]. Chiar și în cantități foarte mici, de până la 0,2 mg/l, sulfatul de cupru duce la scăderea productivității spirulinei, la creșterea cantității produselor de degradare oxidativă a lipidelor și la activarea sistemelor de protecție antioxidantă, exprimată în creșterea activității superoxid-dismutazei și a cantității de prolină [4, pp. 200-227]. Anume activarea sistemelor antioxidante ale celulelor cianobacteriilor asigură capacitatea uimitoare a acestor organisme străvechi de a opune rezistență și a repara eficient daunele cauzate de stresul oxidativ. Astfel, în caz de stres oxidativ moderat, spirulina revine la parametrii fotosintetici normali timp de 4-7 zile, iar metabolismul lipidic și viteza peroxidării revine la valori obișnuite peste șapte zile de la inițierea stresului [5, pp. 188-196]. Acest lucru sugerează că mecanismele de adaptare a cianobacteriilor sunt în strânsă corelare și chiar sunt inițiate de stresul oxidativ și deteriorările oxidative în celule. Cunoașterea detaliată a modificărilor care se produc în biomasa cianobacteriilor în condiții de stres oxidativ ar prezenta un instrument adecvat pentru elaborarea strategiei de înlăturare a toxicității acestora pentru mediul înconjurător, iar în cazul speciilor biotehnologice – pentru obținerea biomasei calitative cu un nivel adecvat de antioxidanți pentru uzul uman.

Scopul cercetărilor reflectate în acest articol a constat în evidențierea modificării parametrilor biochimici ai biomasei de spirulină în condiții de stres oxidativ indus de sulfatul de cupru, precum și a nivelului de corelare a acestora cu markerul stresului oxidativ – dialdehida malonică.

MATERIALE ȘI METODE

Obiect de studiu. În calitate de obiect de studiu a fost utilizată tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis* CNMN-CB-11 din Colecția Națională de Microorganisme Neputogene.

Condiții experimentale. În calitate de mediu nutritiv pentru cultivarea spirulinei a fost utilizat mediul mineral SP1 fără sulfat de cupru, cu următoarea componență: macroelemente (în g/l): NaNO_3 -2,5; NaHCO_3 -2,0; NaCl -1,0; K_2SO_4 -0,6; Na_2HPO_4 - 0,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2; CaCl_2 -0,024; 1ml/l soluție de microelemente ce conține (mg/l (mediu): H_3BO_3 -2,86; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,81; MoO_3 -0,015); FeEDTA -1ml/l [6]. Au fost respectați parametrii și condițiile de cultivare

în laborator: temperatura de 32-35°C, pH-ul mediului 8-9, intensitatea iluminării de 55 μmol fotoni/ m^2 /s. Stresul oxidativ a fost indus prin adăugarea $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 5 mg/l. Sulfatul de cupru a fost adăugat la prepararea mediului nutritiv sau peste 72 de ore după inocularea culturii.

Colectarea probelor. Pe durata experienței, începând cu ziua a treia de cultivare, la intervale de 24 de ore, din fiecare recipient s-au colectat 10 ml suspensie. Biomasa a fost separată prin filtrare în vid și demineralizată prin spălare repetată cu soluție izotonică de acetat de amoniu. După standardizare, biomasa este supusă testelor conform metodelor descrise mai jos.

Prepararea extractelor. Pentru obținerea extractelor etanolice a fost preparat amestecul din 10 mg biomasă și 1 ml alcool etilic care a fost supus agitării timp de 120 min la temperatura camerei. Extractele etanolice obținute au fost separate de biomasă prin centrifugare. Extractele hidrice au fost obținute prin tehnica congelării/decongelării repetate a amestecului de biomasă în apă (10 mg biomasă la 1 ml apă distilată). Extractele hidrice obținute au fost separate de biomasă prin centrifugare.

Determinarea activității antioxidante (testul ABTS). În calitate de substrat a fost utilizat radicalul acidului 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic (ABTS). Amestecul de reacție a constat din 0,3 ml extract și 2,7 ml soluție ABTS. Timpul de reacție a fost de 6 min. Rezultatele au fost exprimate în % inhibiție ABTS [7, pp. 604-611].

Determinarea capacității de reducere a fierului. Se mixează proba de biomasă de spirulină (0,1 ml, 10 mg/ml) cu soluție tampon fosfat (0,5 ml, 0,1 M, pH 6,6) și soluție hexacianoferrat de potasiu (0,5 ml, 0,1%). Amestecurile se incubează la temperatura de 50°C timp de 20 min. După incubare se adaugă acid tricloracetic (0,5 ml, 10%) și amestecurile se centrifughează timp de 10 min la 3000 g. La supernatant (1,5 ml) se adaugă soluție clorură de fier (0,2 ml, 0,1%) și 2 ml de apă distilată. Se măsoară densitatea optică la 700 nm [8, pp. 1669-1678; 9, pp. 258-279].

Conținutul de proteine a fost determinat spectrofotometric în baza produselor degradării bazei a proteinelor cu utilizarea reagentului Folin-Ciocalteu [10, pp. 265-275].

Lipidele au fost determinate cu aplicarea reagentului fosfo-molibdenic în baza principiului degradării acide a lipidelor [11, pp. 307-315].

Conținutul de carotenoizi a fost determinat spectrofotometric la 450 nm, după extragerea lor în alcool etilic de 96% [12, pp 337-341].

Gradul de peroxidare a lipidelor a fost determinat în baza dialdehidei malonice (DAM), prin produsele

reacției cu acidul tiobarbituric rezultate în urma oxidării lipidelor [13, pp. 1008-1018]. Valoarea MDA a fost exprimată prin absorbanța determinată la 535 nm.

Toate experiențele au fost efectuate în cinci repetări. Semnificația statistică a fost evaluată prin analiza unidirecțională a varianței urmată de t-testul Student. Analiza corelațională a fost efectuată aplicând Microsoft Office Excel.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Este cunoscut faptul că ionii de Cu(II) sunt toxici pentru *Spirulina platensis*. În același timp, cuprul este o componentă structurală esențială a macromoleculor ca centru de coordonare și menținere a structurii de ordin superior. Este necesar pentru funcționarea a peste 30 de enzime, inclusiv superoxid dismutaza, ceruloplasmina, lizil oxidaza, citocrom c oxidaza, tirozinaza, dopamin beta-hidroxi-laza ș.a. În mediul uzual, utili-

zat pentru creșterea spirulinei în condiții de laborator sau în cele industriale, cuprul este inclus în formă de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ în cantitate de 0,08 mg/l. În experiențele reflectate în acest articol, cantitatea de sulfat de cupru (II) utilizată a fost de 5 mg/l, suficientă pentru a induce un stres oxidativ pronunțat la *Spirulina platensis*.

În figura 1 sunt prezentate rezultatele pentru principalii parametri care caracterizează cultura de spirulină în condiții normale și în condiții de stres oxidativ indus de sulfatul de cupru, 5 mg/l. Rezultatele obținute diferă esențial în funcție de timpul de adăugare a $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Astfel, toxicitatea înaltă a sulfatului de cupru poate fi observată în cazul adăugării sării respective la începutul ciclului de cultivare. În aceste condiții, cantitatea biomasei de spirulină colectate la ziua a șasea a ciclului vital este de peste trei ori mai mică față de proba martor (figura 1, I, A). Și în cazul adăugării sulfatului de cupru după 72 de ore de cultivare este evidentă influența negativă a sării asupra

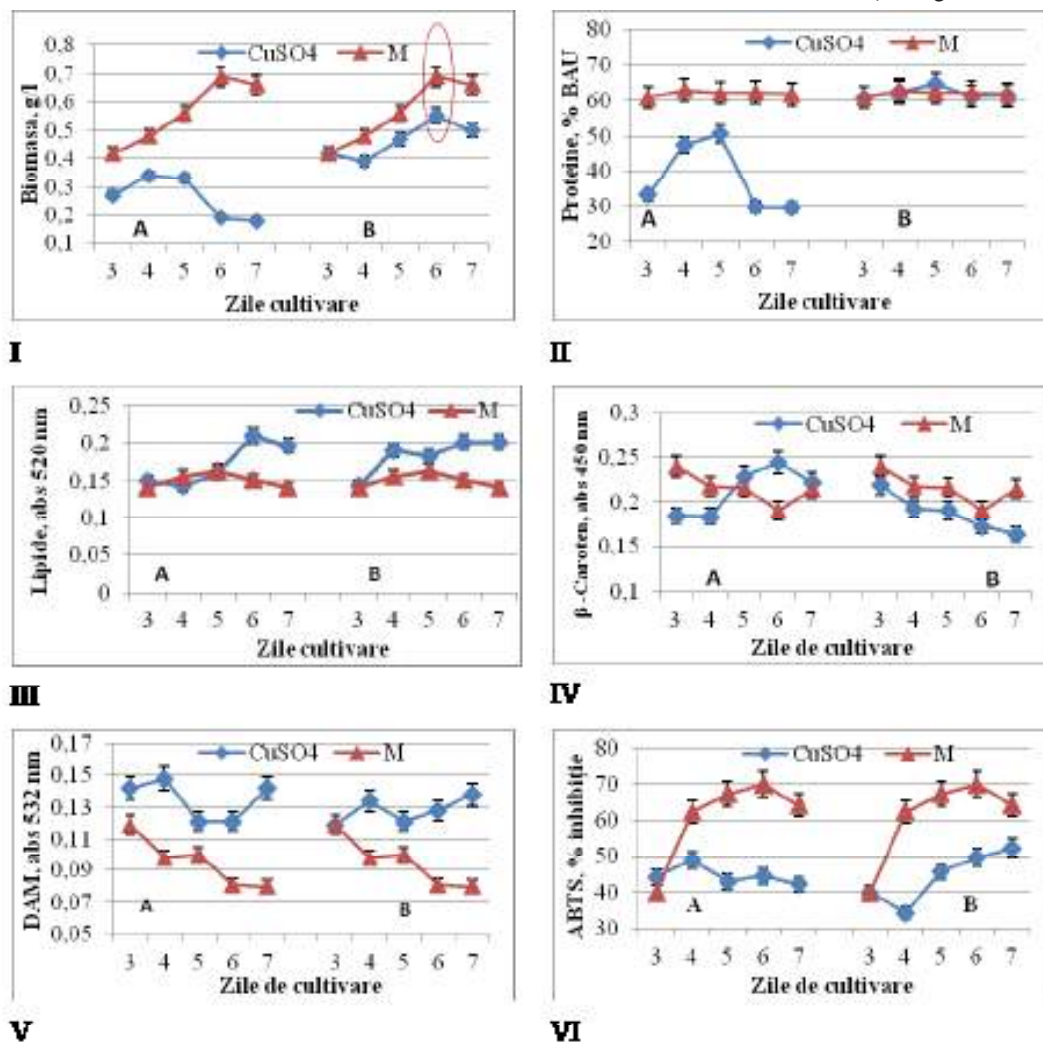


Figura 1. Modificarea parametrilor biochimici ai spirulinei în condiții de stres oxidative indus de sulfatul de cupru (5 mg/l) la adăugarea lui la inoculare (variantele notate cu A) și peste 72 de ore după inoculare (variantele notate cu B):

I – cantitatea de biomasă; II – cantitatea de proteine în biomasă; III – lipidele în biomasă; IV – carotenoizi;
V – cantitatea de DAM; VI – activitatea antioxidantă a extractelor hidrice din biomasă.

acumulării biomasei de către spirulină, dar diferența dintre proba experimentală și martor nu a fost atât de pronunțată și a constituit 19,1% (figura 1, I, B).

Efectul toxic al sulfatului de cupru asupra culturii de spirulină a fost confirmat și prin nivelul dialdehidei malonice în biomasă. Această substanță reprezintă un produs citotoxic, rezultat din procesul de peroxidare a lipidelor, este un indicator recunoscut al formării de radicali liberi și, prin urmare, un marker adecvat al stresului oxidativ. Din figura 1, V se vede că indiferent de timpul de adăugare a sării de cupru, conținutul de DAM în variantele experimentale depășește semnificativ conținutul ei în biomasă martor (la finele experienței – de ≈ 2 ori). Astfel, chiar și în condițiile când sarea de cupru (II) este adăugată după trei zile de cultivare a spirulinei, iar cantitatea de biomasă acumulată este destul de înaltă, procesele degradării oxidative în această biomasă sunt la fel de intense ca și în cazul adăugării sulfatului de cupru la începutul ciclului de cultivare.

Dintre numeroasele ținte biologice ale stresului oxidativ, lipidele sunt cea mai implicată clasă de biomoleculă. În timp ce în condiții de stres crește intensitatea proceselor de peroxidare, conținutul de lipide totale în biomasă de spirulină supusă stresului oxidativ provocat de CuSO_4 este superior martorului (figura 1, III, A, B). La finele experienței, cantitatea lipidelor acumulate în biomasă variantelor cu stres indus a fost cu $\approx 30\%$ mai mare comparativ cu martorul.

Conținutul de carotenoizi de asemenea se modifică semnificativ în condiții de stres indus (figura 1, IV). Este cunoscut faptul că acești pigmenți se caracterizează nu numai ca antene pentru captarea energiei cuantelor de lumină, ci și ca antioxidanți puternici. Efectul lor protector se manifestă în special în condiții de stres fotooxidativ [14, pp. 86-99]. În cazul adăugării sulfatului de cupru după trei zile de cultivare, conținutul de caroten în biomasă de spirulină este stabil mai jos comparativ cu martorul, iar la sfârșitul experienței este cu 23,8% mai mic comparativ cu martorul (figura 1, IV, B).

În cazul adăugării sulfatului de cupru la începutul ciclului de creștere, în etapa de creștere exponențială conținutul de carotenoizi este mai mic decât în martor, iar la trecere în faza staționară are loc o creștere a conținutului de pigmenți galbeni cu un maximum la ziua a șasea de cultivare (figura 1, IV, A). Aceasta indică asupra rolului diferit pe care îl au acești pigmenți la diferite etape ale ciclului vital, cel mai probabil rolul protector fiind caracteristic fazei staționare.

Conținutul proteinelor în biomasă de spirulină este un indicator stabil și supus mai puțin fluctuațiilor valorice în funcție de condițiile de mediu. Din acest

motiv, conținutul total de proteine este mai puțin studiat în calitate de marker al stresului. Cu toate acestea, în cazul primei variante de stres indus, în biomasă de spirulină se înregistrează o scădere semnificativă a conținutului de proteine, deosebit de pronunțată în faza staționară – de peste două ori mai puține proteine comparativ cu martorul (figura 1, II, A). În cazul când stresul oxidativ a fost indus după trei zile de cultivare, nu au fost înregistrate diferențe statistic veridice între conținutul de proteine în variantele experimentale și proba martor (figura 1, II, B).

Activitatea antioxidantă în biomasă de spirulină supusă stresului oxidativ, indiferent de timpul de inducere a stresului, a fost semnificativ mai joasă comparativ cu martorul. Astfel, la finele experienței, inhibiția radicalului cation ABTS în biomasă variantelor experimentale a fost cu 36% mai joasă comparativ cu martorul în prima variantă de stres (figura 1, VI, A) și cu 20% în cea de-a doua variantă de stres (figura 1, VI, B).

Astfel, sulfatul de cupru (II) în cantitate de 5 mg/l produce o stare de stres oxidativ în cultura de *Spirulina platensis* CNMN-CB-11, confirmat prin reducerea cantității de biomasă și a activității antioxidante a acesteia, creșterea conținutului de lipide totale și de dialdehidă malonică, precum și prin modificări semnificative ale conținutului de proteine și carotenoizi.

După cum am menționat anterior, „stresul oxidativ” este un termen utilizat pentru a defini dezechilibrul dintre concentrațiile de SRO și mecanismele de apărare ale celulei. Deși în general se acceptă o astfel de situație, termenul „stres oxidativ” este inadecvat. Analiza datelor din literatura de specialitate demonstrează că stresul oxidativ nu poate fi definit în termeni universali, iar criteriul bazat pe cuantificarea produselor peroxidării lipidelor nu pot fi considerate ca o estimare generală a statutului redox individual. În același timp, nivelele de antioxidanți prezintă o relație nemonotonă cu alte criterii ale stresului oxidativ [15, pp. 298-304]. Evidențierea corelărilor dintre diferiți parametri este una dintre cele mai sigure căi de a selecta un set adecvat de biomarkeri, care să descrie cât mai realist statutul redox al celulelor vii în condiții de stres oxidativ. Figura 2 reflectă unele dintre corelările evidențiate în cadrul cercetărilor descrise în acest articol.

Anterior am stabilit că în majoritatea cazurilor în condiții de stres oxidativ la cultura de *Spirulina platensis* se observă o corelare inversă între conținutul de proteine totale și produsele degradării oxidative ale lipidelor. Și în experiența descrisă în variantele experimentale, în care stresul oxidativ a fost indus cu sulfat

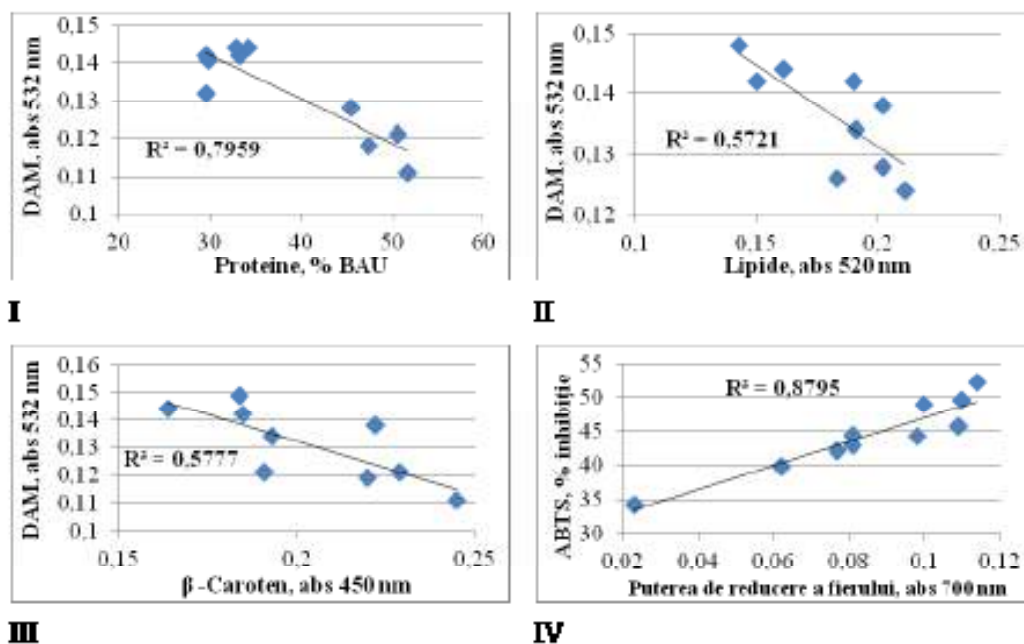


Figura 2. Corelarea între diferiți indici ai biomasei de spirulină în condiții de stres oxidativ indus prin adăugarea CuSO_4 (5 mg/l).

de cupru, suplimentat la mediul de cultivare a spirulinei din prima și a treia zi de cultivare, a fost determinată corelarea inversă dintre conținutul proteinelor și valorile testului MDA (figura 2, I).

Coeficientul de determinare R^2 în acest caz a fost de 0,7959, iar coeficientul de corelare $r = -0,892$, $p < 0,001$ care corespunde unei dependențe corelaționale pronunțate.

Același tip de corelare a fost stabilit și în cazul conținutului lipidelor acumulate în biomasa spirulinei și în valorile testului MDA pe fundalul stresului indus prin adăugarea sulfatului de cupru în cele două variante (figura 2, II). Coeficientul de determinare R^2 pentru acești doi parametri a fost de 0,5721, iar coeficientul de corelare $r = -0,756$, ceea ce denotă o corelare pronunțată. Astfel, putem spune că în condițiile stresului oxidativ instalat, valorile mici ale dialdehidei malonice corespund concentrației sporite ale lipidelor, sinteza cărora poate fi un răspuns la intensificarea procesului de oxidare a lor în biomasa spirulinei pe durata fazei de creștere exponențială.

La fel, o corelare lineară inversă a fost determinată și pentru conținutul de carotenoizi și cel al dialdehidei malonice în biomasa de spirulină în condiții de stres oxidativ indus prin adăugarea sulfatului de cupru. Astfel, coeficientul de determinare R^2 pentru acești doi parametri a fost de 0,5777, iar coeficientul de corelare $r = -0,76$ care denotă o corelare pronunțată.

După cum a fost stabilit, în condiții de stres oxidativ are loc scăderea activității antioxidante determinate în baza reducerii radical cationului ABTS. Datele

din literatura de specialitate arată că rezultatele obținute prin această metodă corelează cu rezultatele testului de determinare a puterii de reducere a fierului [11, 3]. Aceste metode sunt similare după mecanismul reacției redox. Se consideră că în cazul reactivității joase a unor componente fenolice, pentru care durata reacției este peste 6 minute, testul de reducere a Fe(III) este mai avantajos. În cazul spirulinei, capacitatea de reducere a fierului este dependentă de componentele biomasei și nu a extractelor din biomasă. Pornind de la aceste premise teoretice, am decis să verificăm existența corelării între aceste metode în cazul stresului oxidativ indus de sulfatul de cupru în cultura de spirulină. Rezultatele obținute au demonstrat că între valorile testului ABTS pentru extractele hidrice și ale puterii de reducere a fierului pentru variantele experimentale cu sulfatul de cupru, coeficientul de corelare este $r = 0,937$, $p < 0,001$ (figura 1, IV). Astfel, aceste două metode pot fi utilizate pentru determinarea capacității antioxidante a biomasei de spirulină în condiții de stres oxidativ provocat de prezența ionilor de Cu(II) .

CONCLUZII

Sulfatul de cupru (II) în cantitate de 5 mg/l produce o stare de stres oxidativ în cultura de *Spirulina platensis* CNMN-CB-11, confirmat prin reducerea cantității de biomasă și a activității antioxidante a acesteia, creșterea conținutului de lipide totale și de dialdehidă malonică, precum și prin modificări semnificative ale conținutului de proteine și carotenoizi. Între valorile

obținute pentru markerul stresului oxidativ, dialdehida malonică, și conținutul de proteine, lipide și carotenoizi au fost stabilite corelări inverse (coeficientul de corelare având valori de la -0,892 până la -0,756) în condiții de stres oxidativ provocat de prezența ionilor.

Valorile testului de reducere a radicalului cation ABTS și a celui de determinare a puterii de reducere a fierului corelează strâns, ambele metode fiind adecvate pentru evaluarea activității antioxidante a biomasei de spirulină în condiții de stres oxidativ indus.

BIBLIOGRAFIE

1. Tóth T.N., et al. Carotenoids Are Essential for the Assembly of Cyanobacterial Photosynthetic Complexes. In: *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 2015, 1847 (10).
2. Martínez-Ruiz E. B., and Martínez-Jerónimo F. How Do Toxic Metals Affect Harmful Cyanobacteria? An Integrative Study with a Toxigenic Strain of *Microcystis Aeruginosa* Exposed to Nickel Stress. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 133.
3. Cassier-Chauvat C., and Chauvat F. Responses to Oxidative and Heavy Metal Stresses in Cyanobacteria: Recent Advances. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 16 (1).
4. Choudhary M. et al. Effect of Heavy Metal Stress on Proline, Malondialdehyde, and Superoxide Dismutase Activity in the Cyanobacterium *Spirulina Platensis*-S5. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 66(2).
5. He Y. Y., Manfred K., and Hader D. P. Adaptation of Cyanobacteria to UV-B Stress Correlated with Oxidative Stress and Oxidative Damage. In: *Photochemistry and Photobiology*, 2002, 76(2).
6. Rudic V. ș.a. *Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice*. Chișinău: Știința, 2007, 364 p.
7. Prieto P., Pineda M., Aquilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 1999, 10.
8. Dorman H.J.D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. In: *J Agric Food Chem*, 2003, 51.
9. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. In: *Jpn. J. Nutr.* 1986, 44.
10. Lowry O.H., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193.
11. Johnson K.R, Ellis G., Toothill C. The sulfophosphovanillin reaction for serum lipids: a reappraisal. In: *Clin. Chem.* 1977, 23(9).
12. Delia B. Rodriguez-Amaya. *A guide to carotenoid analysis in food*. SILSI PRESS. International Life Sciences Institute. One Thomas Circle, N.W. Washington, D. C. 20005-5802, USA. 2001. 64 p.
13. Hodges M., Forney F., Prange R. Improving the thiobarbituric acid reactive substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 1999, 207.
14. Zhu, Yuehui et al. Roles of Xanthophyll Carotenoids in Protection against Photoinhibition and Oxidative Stress in the Cyanobacterium *Synechococcus* Sp. Strain PCC 7002. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 504(1).
15. Ismaiel M. M.S., El-Ayouty Y.M, and Piercey-Normore M. Role of pH on Antioxidants Production by *Spirulina* (*Arthrospira*) *Platensis*." *Brazilian Journal of Microbiology*. 2016, 47 (2).



Irina Șuh. *Oglindă*, 2010, batik, mătase, 58 × 87 cm