



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**THAÍS CONCEIÇÃO ALMEIDA AIRES**

**Potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao  
*Lactobacillus rhamnosus***

Recife,  
2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**THAÍS CONCEIÇÃO ALMEIDA AIRES**

**Potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao  
*Lactobacillus rhamnosus***

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Lúcia Figueiredo  
Porto

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Taciana  
Cavalcanti Vieira Soares

Recife,  
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A298p Aires, Thais Conceição Almeida  
Potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao  
*Lactobacillus rhamnosus* / Thais Conceição Almeida Aires. – 2019.  
54 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
Coorientadora: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal,  
Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências.

1. Polissacarídeos 2. Probióticos 3. Alga vermelha 4. Prebióticos  
I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orient. II. Soares, Maria Taciana  
Cavalcanti Vieira, coorient. III. Título

CDD 636.089

**THAÍS CONCEIÇÃO ALMEIDA AIRES**

**Potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao  
*Lactobacillus rhamnosus***

Dissertação apresentada ao Programa de  
Biotecnologia Animal da Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, como pré-requisito para  
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia  
Animal.

**Dissertação aprovada no dia 29/03/2019 pela banca examinadora:**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Ana Lúcia Figueiredo Porto  
UFRPE  
(Orientadora - Presidente)

---

Profª Drª Raquel Pedrosa Bezerra  
UFRPE  
(Membro interno)

---

Profª Drª Juanize Matias da Silva  
UFRPE  
(Membro interno)

---

Profª Drª Camila Souza Porto  
UFAL  
(Membro externo)

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de me especializar e ampliar os conhecimentos, para que a cada dia possa cumprir a missão da educação, pois sem uma força divina eu não teria chegado até aqui.

Agradeço aos meus pais, por incentivarem os estudos e por me educarem com princípios e valores fundamentais para a vida. Gratidão!

Agradeço as minhas irmãs pelas palavras de encorajamento e por sempre acreditarem em mim, e nos meus sonhos. Vocês é parte disso!

Agradeço ao meu marido e fiel companheiro por todo incentivo e paciência nas minhas ausências e momentos de estresse. Momentos compreendidos e sempre alinhados com palavras de carinho e encorajamento.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Porto por me receber e abrir as portas do seu excelente grupo, e os ensinamentos na caminhada alinhados de pensamentos positivos. À professora Dr<sup>a</sup> Maria Taciana por sua orientação e conforto nos meus momentos de tristeza. A vocês serei eternamente grata!

A minha amiga e companheira Karoline por todos os ensinamentos e companheirismo, e por toda paciência nos fins de semana, feriados e até na madrugada. Você foi essencial nos momentos mais difíceis.

A Meire por dedicar o seu tempo me ensinando e estando comigo no laboratório. Muita gratidão!

A Marllyn pelo auxílio na análise da citotoxicidade, minha gratidão!

A amiga Viviane que tive a oportunidade de conhecer e admirar. Levarei no meu coração.

A minha amiga Hayanna que tenho total respeito e admiração, uma profissional exemplar que amo.

Aos colegas do laboratório de bioativos da UFRPE pela oportunidade da convivência, do acolhimento, da partilha e motivação.

Aos professores que tive a oportunidade de conviver e aprender, vocês são inspirações para nós!

Aos amigos do trabalho pela paciência na minha ausência e pela força nos momentos mais difíceis. A Nara, em especial pela compreensão.

A todos que sofreram com a minha ausência, mas mesmo assim me apoiavam e faziam questão de se mostrar presente.

Enfim, a todos que de alguma forma seja direta ou indiretamente estavam comigo nesse projeto.

Respeito e gratidão!

## RESUMO

A manutenção da microbiota saudável tem se revelado como uma prevenção à saúde e doenças crônicas. Os prebióticos contribuem como o alimento para os probióticos a partir da fermentação, conferindo vários benefícios. Novas fontes de prebióticos vêm sendo estudadas, dentre elas as algas marinhas. A macroalga *Gracilaria birdiae* devido a sua composição nutricional e por ter os seus polissacarídeos não digeridos pelas enzimas digestivas, além de resistência ao pH ácido, se revela com esse potencial. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao *Lactobacillus rhamnosus*. A *G. birdiae* foi adquirida em pó pela Associação de Maricultoras do Rio do Fogo – RN. Com o pó de *G. birdiae* foi analisado a composição nutricional e foi avaliado a sua toxicidade *in vitro* em diferentes concentrações, por meio do método MTT. O efeito prebiótico foi analisado em três grupos testes com os polissacarídeos da *G. birdiae*, três grupos controle com inulina e um grupo negativo, onde foram verificadas as células viáveis do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* e o pH, no intervalo de 24 horas, 48 horas e 72 horas. Do líquido metabólico de melhor crescimento foi analisada a atividade antimicrobiana na inibição das bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A macroalga *G. birdiae* apresentou na composição 8,7g de cinzas, 5,27g de açúcares totais, 0,085g de lipídios e 4,15g de proteínas para cada 100g de biomassa. Não foi apresentada toxicidade em nenhuma das concentrações do pó de *G. birdiae* investigadas. O melhor resultado foi do grupo teste, o que continha 0,50% de polissacarídeos de *G. birdiae*, que obteve  $3,07 \times 10^8$  UFC/ml no crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* no tempo de 72 horas, e houve manutenção no pH ácido. Não houve inibição do crescimento de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Os polissacarídeos de *G. birdiae* foram eficientes no crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* e se revelaram como potencial prebiótico, onde favorecerá a saúde a partir do seu consumo direto, ou como aditivo na produção de novos alimentos.

**Palavras-chave:** Polissacarídeos. Probiótico. Microbiota. *Rhodophyta*.

## Abstract

The maintenance of healthy microbiota has proved to be a health and chronic disease prevention. Prebiotics contribute as the feed for probiotics from the fermentation, conferring several benefits. New sources of prebiotics have been studied, among them marine algae. The macroalgae *Gracilaria birdiae* due to its nutritional composition and to have its polysaccharides not digested by the digestive enzymes, besides resistance to the acid pH, is revealed with this potential. Therefore, the objective of this study was to evaluate the prebiotic potential of *Gracilaria birdiae* algae against *Lactobacillus rhamnosus*. *G. birdiae* was purchased in powder form by the Rio do Fogo - RN Mariculture Association. With the *G. birdiae* powder the nutritional composition was analyzed and its in vitro toxicity was evaluated in different concentrations by means of the MTT method. The prebiotic effect was analyzed in three test groups with *G. birdiae* polysaccharides, three inulin control groups and one negative group, in which the viable probiotic *Lactobacillus rhamnosus* cells and the pH were verified in the 24 hour, 48 hour and 72 hours. Of the best growth metabolic liquid, the antimicrobial activity in the inhibition of the bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was analyzed. The macroalgae *G. birdiae* presented in the composition 8.7 grams of ash, 5.27 grams of total sugars, 0.085 grams of lipids and 4.15g of protein per 100g of biomass. No toxicity was reported at any of the concentrations of the *G. birdiae* powder investigated. The best result was from the test group, which contained 0.50% of *G. birdiae* polysaccharides, which obtained  $3.07 \times 10^8$  CFU / ml on the growth of *Lactobacillus rhamnosus* in 72 hours, and maintained at acidic pH. There was no inhibition of the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. The *G. birdiae* polysaccharides were efficient in the growth of *Lactobacillus rhamnosus* and proved to be prebiotic potential, where it will favor health from its direct consumption or as additive in the production of novel foods.

**Keywords:** Polysaccharides. Probiotic. Microbiota. Rhodophyta.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1 Alimentos funcionais</b> .....	12
<b>2.2 Probióticos</b> .....	14
2.2 <i>Probiótico Lactobacillus rhamnosus</i> .....	16
<b>2.3 Prebióticos</b> .....	17
<b>2.4 Fonte alternativa de prebiótico</b> .....	19
2.4.1 <i>Gracilaria birdiae</i> .....	21
2.4.2 Composição nutricional das algas.....	24
2.4.3 Composição em polissacarídeos do gênero <i>Gracilaria</i> .....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	28
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	28
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>5. CAPÍTULO 1</b> .....	36
<b>5.1 Artigo 1</b> .....	36
Resumo .....	37
Introdução .....	37
Material e Métodos .....	39
Resultados e Discussão .....	43
Conclusão .....	48
Referências .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

O estilo de vida da população associado a sua má alimentação vem acarretando no aparecimento de várias doenças, entre elas diabetes, câncer, doenças inflamatórias, hepatopatias, obesidade e dislipidemia. Estudos revelam que uma microbiota saudável traz benefícios na prevenção, e que uma disbiose poderia favorecer a essas doenças, além de já se ter evidências com o aparecimento de doenças como depressão e anorexia nervosa (CHEN et al., 2019).

A disbiose é conhecida quando há um desequilíbrio da microbiota intestinal, reduzindo os micro-organismos benéficos e favorecendo a entrada de patógenos e o aparecimento de doenças. A microbiota é particular e diverge de acordo com condições ambientais e de vida, e pode ser estimulada com o consumo de alimentos funcionais como probióticos e prebióticos (DANNESKIOLD-SAMSØE et al., 2019).

Os probióticos são micro-organismos benéficos responsáveis por conferir vários benefícios ao hospedeiro, como a produção de vitaminas, como a K e vitaminas do complexo B a riboflavina e tiamina, a manutenção estável da microbiota, a resistência a colonização de patógenos, auxílio na digestão da lactose, melhora do sistema imune, diminuição do risco de câncer, e auxílio no tratamento de doenças psíquicas como ansiedade e depressão e obesidade (ROUXINOL-DIAS et al., 2016; GU; LI, 2016; CHONG, 2014; FOSTER; NEUFELD, 2013; SAAD et al., 2011). Pertencem aos gêneros de probióticos às espécies *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, e algumas espécies de leveduras, como as do gênero *Saccharomyces* (GULLÓN et al., 2014).

O aumento dos micro-organismos probióticos é estimulado pelo consumo de prebióticos, que são caracterizados como componentes capazes de modular o crescimento de micro-organismos benéficos, e influenciar positivamente os seus efeitos sobre o organismo hospedeiro (OLVEIRA; GONZÁLEZ-MOLERO, 2016).

Os prebióticos mais utilizados na indústria são a inulina e os FOS, reconhecidos como ingredientes Generally Recognized as Safe (GRAS) nos Estados Unidos e como Foods of Specified Health Use (FOSHU) no Japão, o que permite seu uso sem restrições em grande quantidade de alimentos. Junto aos probióticos movimentam um mercado de consumidores de alimentos funcionais adeptos a alimentação saudável e preocupados com a longevidade (CORZO et al, 2015).

Probióticos e prebióticos são considerados alimentos funcionais, que possuem compostos bioativos com papel metabólico ou fisiológico na promoção à saúde. Esses alimentos representam uma fatia importante no mercado que faturou no Brasil em 2016 R\$ 93,6 bilhões (EUROMONITOR, 2019). Por isso, há um interesse no estudo de novas fontes alternativas de prebióticos, que possam ter comprovação científica e ser reconhecido para o seu uso. Dentre essas fontes, há estudos com xilooligosacarídeos, lactosacarose, oligossacarídeo de soja, polidextrose e polissacarídeos de macroalgas (CORZO et al, 2015).

Para que um alimento seja potencial prebiótico ele não pode ser digerido pelas enzimas do colón e deve estimular seletivamente as bactérias benéficas. Os polissacarídeos encontrados nas macroalgas não são digeríveis pelas enzimas do sistema digestivo, e podem ser fermentadas pela microbiota intestinal, revelando um potencial efeito prebiótico (SULLIVAN L et al, 2010, RUPEREZ P; GOMEZ-ORDONEZ E; JIMENEZ-ESCRIG A , 2013).

As macroalgas são organismos fotossintetizantes pluricelulares e sem vascularização, classificadas de acordo com a composição pigmentar como *Chlorophytas* (algas verdes), *Phaeophytas* (algas pardas) e *Rhodophytas* (algas vermelhas). As Gracilariales são macroalgas que pertencem ao filo *Rhodophyta*, sendo um dos gêneros mais importantes da classe (VASCONCELOS; GONÇALVES, 2013, RAVEN, 2007).

A China é o maior produtor de maricultura do mundo (YANG et al., 2015), com o uso para a indústria de produção de ágar, na produção para ração de abelhas e na melhora da qualidade da água (FEI, 2004), e no Brasil há cultivos consolidados de espécies de *Gracilaria* na costa do Nordeste, no Rio grande do Norte, Ceará e Paraíba, com destaque para a *Gracilaria Birdiae* (URSI et al., 2013; HAYASHI et al. 2014; AYRES-OSTROCK et al. 2016).

As comunidades costeiras Nordestinas estão entre as mais pobres e marginalizadas do Brasil, dependendo exclusivamente da pesca artesanal para o seu sustento. Em estudo realizado por Santos Júnior (2017) sobre a viabilidade econômica na produção de *G. birdiae* com a Associação de Maricultoras de Rio do Fogo – AMAR, foi identificado que a maricultura é de grande importância social e

econômica para a renda das famílias, fornecendo uma média de um salário mínimo por mês para cada maricultora.

De acordo com MILLEDGE; NIELSEN; BAILEY (2016), o cultivo de *Rhodophytas* contribuiu significativamente para a expansão na produção de algas marinhas a nível global, passando de 2 milhões de toneladas molhadas em 2000 (21% da produção de todas as algas cultivadas) para 9 milhões de toneladas molhadas em 2010 (47%), devido principalmente ao seu uso diretamente na alimentação, bem como ao aumento da procura por ficocolóides em alimentos processados (VALDERRAMA et al., 2014; COSTA, 2015). A simplicidade nas técnicas de cultura e alta biomassa também aumenta a disponibilidade comercial destas algas marinhas (JONG, et al., 2015).

As aplicações comerciais dos polímeros das algas vermelhas são nas indústrias nutracêutica, cosmética e, sobretudo alimentícia, como um substituinte do amido e da gordura, especialmente na indústria de enlatados e laticínios, na produção de gelatinas e geleias, além do uso como espessante, emulsificante e estabilizante (GRESSLER et al., 2010; BLOUIN et al., 2011; HOLDT; KRAAN, 2011; FIDELIS, 2014). O estudo dos polissacarídeos encontrados nas algas tem despertado interesse da medicina e da biotecnologia, devido ao fato de possuírem várias atividades biológicas importantes, como anticoagulante, antitrombótica e imunoestimulante (RODRIGUES et al., 2009).

Com relação à composição nutricional e absorção dos nutrientes, para a alga *G. birdiae* há poucos estudos. Segundo Gómez-Ordóñez; Jiménez-Escrig; Rupérez (2012) a composição química desta espécie demonstra um alto valor nutricional com elevado conteúdo proteico e de fibras, constituindo assim uma excelente fonte de nutrientes para humanos e animais.

Neste contexto, apesar de já se utilizar as macroalgas em diversos produtos e como alimentos, há a necessidade de estudos sobre o potencial de alguns componentes, como a possibilidade de ser um novo prebiótico e a utilização em atividades biológicas. A *G. Birdiae* tem um fácil cultivo, e ampla produção na região do nordeste brasileiro, sustentando várias famílias. Portanto, o estudo objetivou avaliar o potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao *Lactobacillus rhamnosus*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Alimentos funcionais**

O mercado de alimentos funcionais cresce à medida que os consumidores buscam nos alimentos, não apenas seus nutrientes para satisfazer suas necessidades biológicas, mas sim os benefícios associados ao seu consumo, ofertando assim oportunidades e uma tendência do segmento, onde segundo a pesquisa realizada pela Euromonitor internacional (2019) o mercado de alimentos e bebidas saudáveis faturou R\$ 93,6 bilhões em 2016.

Essa preocupação com a alimentação se tornou hábito constante em diferentes segmentos da população. A grande oferta de alimentos industrializados associados à dificuldade na leitura dos rótulos gera um acervo de informações sobre o assunto, onde políticas públicas estimulam a alimentação saudável, como promoção na qualidade de vida, se destacando no mercado os alimentos funcionais e orgânicos (VIANA et al., 2017).

Para que um determinado alimento ou seu constituinte seja associado ao benefício do seu consumo com a saúde é necessário que se atenda as diretrizes básicas para comprovação de sua propriedade, estabelecida no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para ser classificado como com alegação funcional (BRASIL, 1999), e que seja confirmado a segurança do seu consumo, com comprovação científica, para não induzir o consumidor ao erro. As alegações podem descrever o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e nas funções normais do organismo, ou fazer referência à manutenção geral da saúde e à redução do risco de doenças (BRASIL, 1999).

Os alimentos de competência da ANVISA que veiculem essas alegações devem ser enquadrados e registrados na categoria de alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde (BRASIL, 1999) ou na categoria de substâncias bioativas e probióticos isolados (BRASIL, 2002).

Os alimentos com a característica de funcional vêm sendo descrito no Japão desde a década de 80, onde fazia parte de uma nova concepção de alimentos com a finalidade de desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e que tinha uma grande expectativa de vida (ANJO, 2004). Desde então, consumidores preocupados com a saúde e mais conscientes, optam por esses

produtos para fazer parte de uma rotina de hábitos saudáveis, e conseqüentemente aumento na qualidade de vida (NAVARRO-GONZÁLEZ; PERIAGO, 2016).

Os alimentos funcionais oferecem ao hospedeiro benefícios além do seu valor nutritivo e da sua composição química, podendo desempenhar um papel na redução de doenças (NEUMANN, et al., 2000; TAIPINA, et al., 2002). ROBERFROID (2002) descreve as características de um alimento funcional (tabela 1).

**Tabela 1. Características de um alimento funcional**

Devem ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual
Devem ser compostos por componentes naturais, algumas vezes, em elevada concentração ou presentes em alimentos que normalmente não os supririam;
Devem ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental
A alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico
Pode ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido
Pode ser um alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada
Pode ser um alimento no qual a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada

Fonte: Roberfroid (2002).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser de origem vegetal ou animal, atuando no sistema gastrointestinal, no sistema cardiovascular, no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA, et al., 2003). Enquadram-se pela ANVISA como alegações de propriedades funcionais os ácidos graxos, carotenoides, as fibras alimentares, probióticos, antioxidantes, fitoesteróis, polióis e proteínas de soja (BRASIL, 2008).

## 2.2 Probiótico

Os probióticos foram descritos pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965), e a definição internacional do termo, segundo a FAO/OMS é que são "*micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro*" (FAO/WHO, 2002).

O mecanismo de ação dos probióticos ainda não é bem esclarecido, mas resulta de processos que podem atuar isoladamente ou em associação, podendo conferir a produção de substâncias antimicrobianas, a modulação do sistema imunológico, o aumento da barreira epitelial, bem como o aumento a adesão na mucosa intestinal, inibição a adesão de patógenos e exclusão competitiva de micro-organismos indesejáveis (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). A compreensão destes mecanismos favorece a condução de estratégias para uma terapia nutricional personalizada, visando à melhoria de sintomas específicos de determinadas patologias, contribuindo assim para a restauração do funcionamento do intestino (BINNS; LEE, 2010; SAEZ-LARA et al., 2015; XU et al., 2016).

O mercado de probióticos a nível mundial estimou aumento de U\$ 2,7 bilhões em 2011 para U\$ 4 bilhões em 2016, com a venda dos suplementos probióticos, demonstrando a importância dada pela população no consumo de alimentos que possam trazer benefícios com o seu consumo (ARORA, PANDOVE, 2014).

Dentre os probióticos estudados, encontram-se principalmente as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, provavelmente por serem as mais utilizadas na alimentação humana e animal, devido a sua estabilidade e característica (SAAD, 2006).

Os micro-organismos considerados probióticos, segundo a legislação brasileira, que podem ser adicionados aos alimentos com a alegação para contribuir para o equilíbrio da microbiota intestinal são: *L. acidophilus*, *L. casei* shirota, *L. casei* variedade *ramnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum* e *E.faecium* (ANVISA 2008).

Para que um micro-organismo seja um probiótico é necessário o atendimento de algumas características como: capacidade para resistir ao suco gástrico ácido do estômago, aos sais biliares e às enzimas digestivas; capacidade de aderir à mucosa intestinal, conviver com a microbiota intestinal endógena e produzir substâncias que

inibem o crescimento de bactérias indesejáveis, além de estabilidade quando aplicado em alimentos (FAO, 2002).

As alegações de saúde dos probióticos devem estar baseadas em estudos epidemiológicos. No caso de produtos com mais de um micro-organismo ou de produtos que misturem fibras prebióticas com micro-organismos, a comprovação do efeito probiótico deve ser feita para a combinação (BRAASIL, 1999). O mecanismo dos efeitos benéficos e as causas atribuídas aos probióticos é objeto de vários estudos como no tratamento de obesidade, bem como de outras comorbidade (BRAHE, 2015), e foi descrita por Moraes e Colla (2006) quadro 1.

#### **Quadro 1. Causas e mecanismos dos efeitos benéficos atribuídos aos probióticos**

<b>Efeito benéfico</b>	<b>Possíveis causas e mecanismos</b>
Melhor digestibilidade	Degradação parcial das proteínas, lipídios e carboidratos
Melhor valor nutritivo	Níveis elevados das vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos essenciais como metionina, lisina e triptofano
Melhor utilização da lactose	Níveis reduzidos de lactose no produto e maior disponibilidade de lactase
Ação antagonica contra agentes patogênicos entéricos	Distúrbios tais como diarreia, colites mucosa e ulcerosa, diverticulite e colite antibiótica são controlados pela acidez Inibidores microbianos e inibição da adesão e ativação de patógenos
Colonização do intestino	Sobrevivência ao ácido gástrico, resistência a lisozima e à tensão superficial do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato gastrointestinal, modulação imunitária
Ação anticarcinogênica	Conversão de potenciais pré-carcinogênicos em compostos menos perniciosos Estimulação do sistema imunitário
Ação hipocolesterolêmica	Produção de inibidores da síntese do colesterol Utilização do colesterol por assimilação e precipitação como sais biliares desconjugados
Modulação imunitária	Melhor produção de macrófagos, estimulação da produção de células supressoras

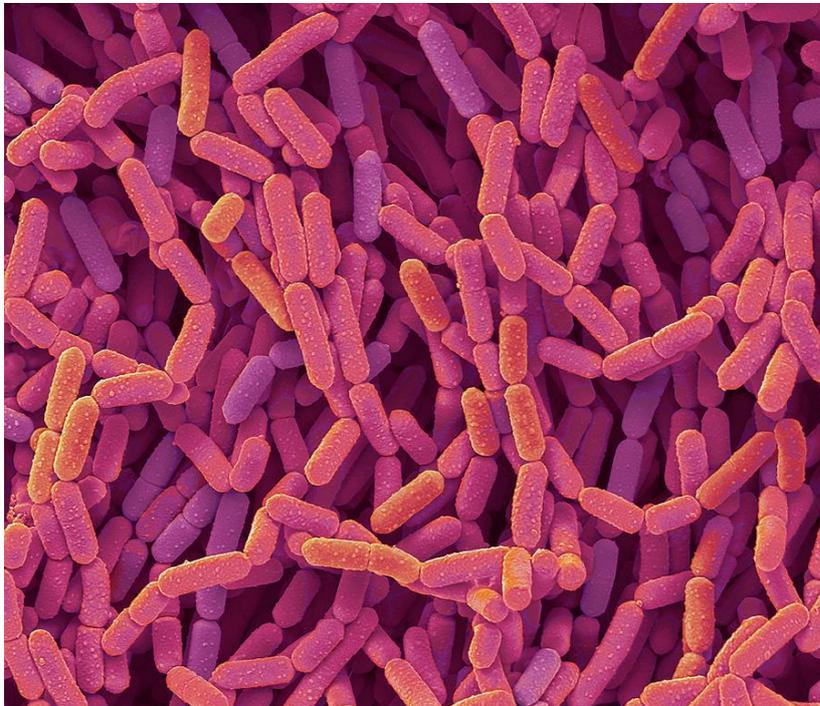
Fonte: Moraes e Colla (2006)

A ANVISA determina que a comprovação de eficácia para efeitos funcionais deve ser estar baseada em evidências científicas robustas, construídas por meio de estudos clínicos, randomizados, duplo-cego e placebos controlados que demonstrem a relação da alegação entre o consumo do produto com matriz equivalente, e o efeito funcional, onde a identificação e mensuração do efeito devem ser claramente definidas. No caso em que o efeito não puder ser mensurado diretamente, devem ser identificados os biomarcadores validados que estão relacionados ao efeito alegado. É fundamental a identificação da cepa e das quantidades testadas nos estudos utilizados como referências (BRASIL, 1999).

### 2.2.1 Probiótico *Lactobacillus rhamnosus*

*Lactobacillus rhamnosus* é uma espécie do grupo taxonômico *Lactobacillus casei*, bactéria Gram positiva e anaeróbia facultativa (Figura 1), é uma bactéria heterofermentativa facultativa e generalista, sendo capaz de crescer em diversas condições, pois é encontrada tanto em diferentes cavidades humanas (intestino, vagina), como também em vários produtos alimentícios artesanais e industriais (DOUILLARD et al., 2013).

Figura 1. *Lactobacillus rhamnosus*



(Fonte: <https://fineartamerica.com/featured/lactobacillus-rhamnosus-bacteria-steve-gschmeissnerscience-photo-library.html>)

Seus efeitos benéficos são conferidos principalmente por motivo da modulação da população e atividade da microbiota intestinal, onde compõem uma fração substancial na mucosa humana (ALONSO; ISAY, 2007). É uma das bactérias probióticas mais estudadas no tratamento de infecções intestinais, e na imunidade intestinal de gestantes, lactentes e crianças (CHEN, 2016).

Em estudo realizado por (YADAV et al., 2018) que avaliou atributos anti-diabéticos de *Lactobacillus rhamnosus* indicou que o probiótico no leite fermentado

foi capaz de melhorar o estado de saúde dos ratos diabéticos, e diminuir os níveis de glicose no sangue, a inflamação e o estresse oxidativo.

Abdel-rahman et al. (2019) verificou que a adição de *Lactobacillus rhamnosus* em alimentos para crianças inibiu e reduziu *Bacillus cereus*, sinalizando um importante benefício do probiótico, haja vista o patógeno ser responsável por vários casos de doenças transmitidas por alimentos. Quando adicionado no queijo *cheddar* o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* conferiu melhor efeito antioxidante aos alimentos (LIU et al., 2018).

O excesso no consumo de alimentos industrializados, ricos em açúcares e gordura, vem trazendo alterações na microbiota intestinal, e aumentando o risco para o desenvolvimento de doenças, para tanto alimentos como probiótico e prebióticos são aliados para este equilíbrio (ORIACH et al., 2016).

### 2.3 Prebiótico

O termo prebiótico é utilizado para designar ingredientes alimentares não digeríveis que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de uma ou um número limitado de espécies bacterianas no cólon, os micro-organismos probióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; COLLINS; GIBSON, 1999). Atualmente, os prebióticos são definidos como "um ingrediente seletivamente fermentado que permite mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal conferindo benefícios sobre o bem-estar e saúde" (GIBSON et al., 2004; ROBERFROID et al., 2010).

Quando ingeridos, os prebióticos sofrem fermentação que, por consequência, estimula o crescimento e a estabilidade dos micro-organismos produtores de ácidos orgânicos, principalmente os ácidos láctico e acético. Estes compostos reduzem o pH do lúmen intestinal e, em conjunto com outras substâncias antibacterianas e enzimas produzidas do trato gastrointestinal, inibem a proliferação de micro-organismos nocivos (SOUZA; SANTOS; SGARBIERI, 2011; CORZO et al, 2015).

Os prebióticos passam pelo intestino delgado para o intestino inferior e tornar-se acessível para as bactérias probióticas sem ser utilizado por outras bactérias intestinais, assim agem modificando a microbiota intestinal, atuando como combustível para as bactérias benéficas como lactobacilos e bifidobactérias, que ao

fermentar o prebiótico produzem gases e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, butirato e propionato (SAULNIER, 2009).

O butirato é o mais benéfico para a saúde do cólon, demonstrando efeito na inibição celular de câncer no cólon. O acetato é utilizado como fonte de energia e participa da síntese do colesterol no fígado, já o propionato estudos o relacionam com o aumento da saciedade, por meio do aumento na produção do hormônio leptina (HINNEBUSCH et al., 2002; POOL-ZOEL; SAUER, 2007; BLOEMEN et al., 2009).

Os prebióticos normalmente utilizados na dieta humana são lactulose, galactooligosacareos, fruto-oligosacareos (FOS), a inulina e os seus hidrolisados, malto-oligosacáridos, e prebióticos amido resistente (GIBSON et al., 2017). A inulina é um dos mais utilizados e é produzida comercialmente em larga escala, oriunda principalmente da chicória, agave e alcachofra de Jerusalém (AL-SHERAJI et al., 2013).

No Brasil, a concentração recomendada de prebióticos para ser utilizados nas formulações é de 2,5 g em uma porção diária, para que o alimento possa ser rotulado como “contribui para o equilíbrio da flora intestinal” (ANVISA, 2016).

Segundo Teixeira (2015) a determinação de uma atividade prebiótica utiliza diferentes metodologias, podendo ter um ou mais critérios da classificação, além do que deve ser considerada também a seletividade dos prebióticos para uma espécie ou um número limitado de micro-organismos (SÓLIDO; GIBSON, 2011). A tabela 2 apresenta as características gerais dos prebióticos.

### **Tabela 2. Características de um alimento prebiótico**

---

Possuir hidratos de carbono não digeríveis, ser resistente às enzimas digestivas
Ser susceptível a fermentação por bactérias intestinais
Ter a capacidade de aumentar a viabilidade e ou a atividade de micro-organismos benéficos, ser seletivo
Ser devem ser estáveis nas condições de processamento como o calor, o pH e reação de <i>Maillard</i>
Possuir capacidade promotora de saúde

---

Fonte: (RASTALL; GIBSON, 2006; YASMIN et al., 2015).

Polissacarídeos de algas não são degradados por enzimas na parte superior do trato gastrointestinal, bem como aumentam o crescimento de bactérias do ácido láctico, podendo então ser utilizados como prebióticos dietéticos (ZAPOROZHETS et al., 2014). Em estudo *in vitro* realizado por Ramnani et al. (2012) com polissacarídeos da macroalga Rhodophyta *Gelidium* foi verificado que estes foram fermentados por bactérias intestinais e exibiram potencial para serem usados como uma nova fonte de prebióticos.

Em outro estudo com biomassa da microalga *Chondrus crispus* também foi verificado propriedades prebióticas, onde Liu et al. (2015) alimentaram ratos com uma dieta suplementada com *C. crispus* e verificaram que a microbiota dos animais foi melhorada, além de também ter havido a produção de ácidos graxos de cadeia curta.

A utilização de prebióticos como componentes alimentares tem várias vantagens, uma vez que melhoram características sensoriais e proporcionam uma composição nutricional mais equilibrada, além de aumentar a vida de prateleira dos alimentos (FRANCK; COUSSEMENTE, 1997). A utilização de probióticos e prebióticos juntos nos alimentos são muitas vezes utilizados, a fim de tirar partido dos seus efeitos sinérgicos em aplicação a produtos alimentares, caracterizando como um alimento simbiótico (CAPELA; HAY; SHAH, 2006).

#### **2.4 Fonte alternativa de prebiótico**

Dentre os novos carboidratos de interesse por seu potencial efeito prebiótico *in vitro* e *in vivo* são encontrados os polissacarídeos de macroalgas marinhas. Por ter sua estrutura química variada e polissacarídeos sulfatados não digeríveis e por sua resistência enzimática (RUPÉREZ, P.; ORDÓÑEZ, E. V.; JIMÉNEZ, A, 2013).

As algas são organismos fotossintéticos, sem vascularização, com ampla diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência, apresentando três processos de reprodução: vegetativo, assexuado e sexuado (VASCONCELOS; GONÇALVES, 2013; BICUDO; MENEZES, 2010). Quanto à morfologia, as algas são consideradas como organismos unicelulares, microscópicas, chamadas de microalgas ou pluricelulares, macroscópicas, chamadas de macroalgas (RAVEN, 2007).

As macroalgas são imprescindíveis, pois em muitos ecossistemas aquáticos atuam como produtores primários na cadeia alimentar, uma vez que sintetizam o material orgânico e o oxigênio necessário para o metabolismo dos organismos consumidores (TURRA et al., 2017), de forma a sustentar mais de dois terços da biomassa do mundo, sendo responsáveis ainda por metade da atividade fotossintética global (PEREIRA et al, 2012).

As macroalgas marinhas são classificadas baseadas na sua composição pigmentar em: *Chlorophytas* (algas verdes), *Phaeophytas* (algas pardas) e *Rhodophytas* (algas vermelhas) (RAVEN, 2007). O filo *Rhodophyta* se constitui no grupo de maior diversidade de espécies dentro das macroalgas marinhas, acredita-se que haja cerca de 500 a 600 gêneros de algas vermelhas, que são representadas por bem mais de 6000 espécies (YOW, 2011).

Das algas vermelhas encontradas as *Gelidiales* e *Gracilariales* são as mais importantes (VASCONCELOS; GONÇALVES, 2013), sendo o cultivo utilizado como uma atividade econômica e como uma alternativa ecológica de uso racional dos recursos naturais (MUÑOZ et al., 2004). A macroalga *Gracilaria birdiae* (Figura 2) é a mais produzida, devido a sua facilidade de adaptação ao cultivo, composição nutricional e ao grande conteúdo de ágar, por isso esse gênero tem sido objeto de estudos, tais como na promoção de benefícios para a saúde, e aplicações diversificadas como na área de alimentos, farmacêutica, biomédica e biotecnológica (MARINHO-SORIANO et al., 2011; URSI et al., 2013).

**Figura 2.** Macroalga *Gracilaria Birdiae*



(Fonte: Associação de Maricultoras de Rio do Fogo- AMAR )

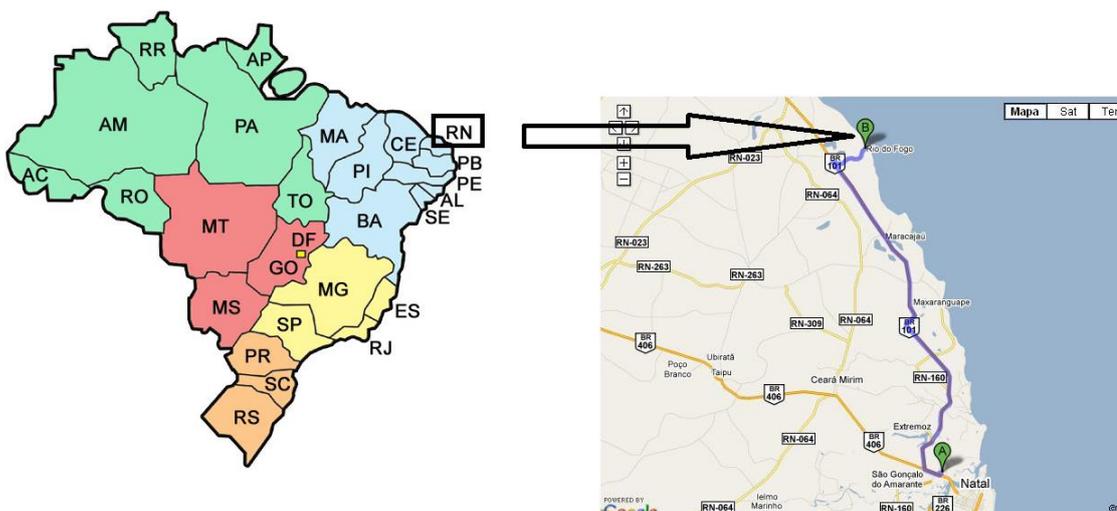
### 2.4.1 *Gracilaria birdiae*

A macroalga *G. birdiae* pertence à família Gracilariaceae e ordem Gracilariales. A espécie foi descrita por Plastino & Oliveira (2002) como sendo de águas tropicais brasileiras, com base em comparações críticas com espécies afins, podendo ser encontrada desde o litoral do estado do Ceará até o Espírito Santo, onde sua estrutura vegetativa é caracterizada por um talo ereto de forma cilíndrica com 2,3 mm de diâmetro, chegando a alcançar até 46 cm de altura.

No Brasil há cultivos consolidados de espécies de *Gracilaria* na costa do Nordeste, no Rio grande do Norte, Ceará e Paraíba, com destaque para a *Gracilaria birdiae* (URSI et al., 2013; HAYASHI et al. 2014; AYRES-OSTROCK et al. 2016). O governo brasileiro tem incentivado projetos de cultivo artesanal para evitar a exploração excessiva e aumentar a renda familiar, melhorando as condições de processamento e identificando utilizações da *G. birdiae* que agreguem valor (TORRES, 2017).

Em estudo realizado por CARNEIRO, MARINHO-SORIANO, PLASTINO (2011) para avaliar a fenologia da *G. birdiae* foram coletadas amostras na praia do Rio do Fogo – RN (figura 3), em diferentes estágios reprodutivos e considerando as condições ambientais do momento da coleta, onde foi verificado que o talo varia de acordo com o clima, e com as condições de nutrientes.

**Figura 3.** Localização Praia Rio do Fogo, Rio Grande do Norte, Brasil.



O cultivo da *Gracilaria* pode ser realizado através de propagação vegetativa em estruturas chamadas *long-line*. Esse modelo é constituído por uma corda principal onde são penduradas cordas secundárias. Para a sua instalação em mar, as extremidades são fixadas geralmente através de blocos de concreto (poitas) para evitar ou minimizar danos durante o cultivo (CARVALHO, 2004). Bezerra e Marinho-Soriano (2010) descreve o cultivo por meio da utilização do sistema de balsas para as espécies marinhas (Figura 4), onde o único manejo (Figura 5) é a retirada de espécies de algas e crustáceos indesejáveis a cada 15 dias e retirada da macroalga geralmente em 60 dias.

**Figura 4.** Cultivo da macroalga *Gracilaria Birdiae* pela Associação de Maricultoras de Rio do Fogo- AMAR Rio do Fogo, RN.



(Fonte: Associação de Maricultoras de Rio do Fogo- AMAR )

**Figura 5.** Manejo *Gracilaria Birdiae* pela Associação de Maricultoras de Rio do Fogo- AMAR Rio do Fogo, RN.



(Fonte: Associação de Maricultoras de Rio do Fogo- AMAR )

Em estudo realizado por Araújo e Rodrigues (2011) foi verificada a curva de crescimento do peso de *G. birdiae* em relação ao tempo de cultivo, identificando uma forte correlação (tabela 3).

**Tabela 3. Relação entre o período de cultivo de *G. birdiae* e o seu ganho de biomassa (g)**

<b>Período de cultivo (dias)</b>	<b>Ganho de biomassa (g)</b>
15	189,40 ± 2,51
30	323,41 ± 3,21
45	487,45 ± 3,36
56	688,00 ± 3,46

Fonte: Araújo e Rodrigues (2011)

A *G. birdiae* possui poucos estudos com relação a sua composição nutricional e absorção dos nutrientes. Segundo Pires et al. (2012) a composição química desta espécie demonstra um alto valor nutricional, com destaque ao elevado conteúdo proteico e de fibras totais, constituindo assim uma excelente fonte de nutrientes para humanos e animais.

#### 2.4.2 Composição nutricional do gênero *Gracilaria*

As algas em geral são reconhecidas, como um alimento nutritivo e hipocalórico, se constituindo de proteína de alto valor biológico, compostos fenólicos, vitaminas do tipo A, B1, C, D e E, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e, em especial, a B12, ausente nos vegetais superiores, e sais minerais (Ca, P, Na e K) (DHARGALKAR; VERLECAR, 2009; GRESSLER et al., 2011; SCHULTZ MOREIRA, 2014; OLIVEIRA, 2015).

As macroalgas demonstram alto valor nutricional, e a sua composição química varia de acordo com as espécies, *habitats*, maturidade e condições ambientais (GÓMEZ-ORDÓÑEZ, 2013; MILLEDGE; NIELSEN; BAILEY, 2016). Em estudo realizado por Chan e Matanjun (2017) com macroalgas vermelhas comestíveis liofilizadas, a *Gracilaria changii* da Sarawak-Malásia, foi encontrado alto teor de cinzas (40,3%), sugerindo a presença de diversos minerais, alto teor de proteínas (12,57%), com teor de aminoácidos de 91,90%, onde destes 55,87% foi de aminoácidos essenciais, baixo teor de lipídios (0,3%) e alto teor de fibra bruta (64,74%).

Na avaliação da composição química de outra espécie de *Gracilaria*, a *Gracilaria edulis*, Sakthivel e Pandima (2015) obtiveram como resultado, teor de cinzas de 8,7%, fibras com 8,9%, proteínas com 6,68% e teor de lipídios de 8,3%. Outros resultados foram encontrados para a espécie *Gracilaria domingensis* extrato seco, onde foram encontrados para cinzas 11,25%, proteínas 10,06%, lipídios 0,45% e carboidratos 66,21% (ESTEVAM et al., 2016).

Para a *Gracilaria birdiae* Pires et al. (2012) encontrou como resultado da análise físico química 12,62% de proteínas, 0,11% de lipídios, 5,58% de cinzas e 50,03% de fibras totais. ESTEVAM (2018) apresentou como resultado na análise da composição nutricional de *G. birdiae* 0,33g de lipídios, 11,06g de proteínas, 4,49g de cinzas, e para as fibras presente na alga 68,61g em 100g de biomassa, e outro estudo com uma espécie diferente do gênero a *G. changii* em análise centesimal foi verificado o percentual de 64,74% para as fibras (CHAN; MATANJUN; TAN, 2014).

O elevado conteúdo de fibras dietéticas nas macroalgas se deve ao seu alto teor de polissacarídeos, presente tanto na composição estrutural, como para reserva

(RUPÉREZ et al., 2010; TABARSA et al., 2012; FIDELIS, 2014). A tabela 4 apresenta percentuais de polissacarídeos em espécies diferentes de *Gracilaria*.

**Tabela 4. Percentual de polissacarídeos encontrados em diferentes espécies de *Gracilaria***

<b>Macroalga</b>	<b>Percentual de polissacarídeos</b>	<b>Autor</b>
<i>Gracilaria edulis</i>	45,50%	Sakthivel e Pandima (2015)
<i>Gracilaria birdiae</i>	27,20%	Souza et al. (2012)
<i>Gracilaria birdiae</i>	47,59%	Torres (2017)
<i>Gracilaria caudata</i>	37,8	Barros et al. 2013

Segundo Torres (2017) fatores relacionados à sazonalidade, diferenças fisiológicas e diferente metodologias de extração podem explicar as variações nas quantidades de polissacarídeos.

#### **2.4.3 Composição em polissacarídeos do gênero *Gracilaria***

As macroalgas biossintetizam moléculas de alta massa molecular, esses polímeros chamados de ficocolóides aderem à parede celular das algas, e exercem funções de seletividade (LIMA, 2013). Os ficocolóides são substância mucilaginosas extraídas de algas pardas e vermelhas, compostas por polissacarídeos coloidais, que em meio aquoso se tornam viscosas (VALENTIN, 2010; FACCINI, 2007).

Os polissacarídeos mais comuns extraídos da *Gracilaria* são o ágar, carragenina e alginato. Esses polissacarídeos de algas marinhas vêm se destacando como novas fontes de fibras e ingredientes alimentares, pois suas fibras não são digeridas por enzimas intestinais e também por sua viscosidade (VIUDA-MARTOS et al., 2010).

O ágar quimicamente é considerado um polissacarídeo complexo com uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose, um dímero constituído por D-galactose e 3,6-anidro- L-galactose e a agarpectina, um polissacarídeo constituído por grupamentos, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico conjugado com agarobiose (HOLDT; KRAAN 2011; FERREIRA, 2015), e é componente estrutural das algas vermelhas (WÜSTENBERG, 2015). Robert Koch utilizou o ágar pela primeira vez para solidificar o meio de cultura, em meados do séc. XIX., Períodos após em 1921 a produção do ágar por ciclos de congelamento-

descongelamento iniciou na Califórnia, Estados Unidos, por Chokichi Matsuoka, um japonês que registou a patente em 1923 (IBERAGAR, 2010).

A agarose é industrialmente obtida principalmente a partir de algas marinhas das ordens Gracilariales e Gelidiales, e é o principal componente responsável pela capacidade de gelificação (CANELÓN et al., 2014). As aplicações de agarose e ágar descritos na literatura são principalmente na área farmacêutica, alimentícia e biotecnológica, onde são utilizadas em meios de separação e purificação como eletroforese em gel, cromatografia de grânulos de gel, cromatografia de exclusão de tamanho, em produtos de química fina, hormônios, enzimas, vacinas, suspensão para radiografar o trato gastrointestinal, dispositivos de liberação contínua, produção de moldes utilizados em odontologia, criminologia, substituto de gelatina e refeição vegetariana, além de amplamente utilizada como meio de cultura para microrganismos e uso biotecnológico (RINAUDO, 2008).

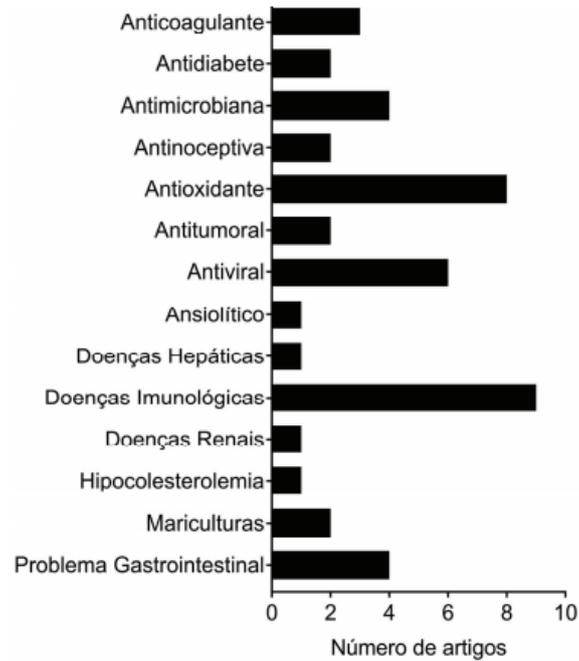
A carragenana tem propriedades gelificante, estabilizante e espessante, além de características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada capacidade de retenção de água e a resistência mecânica dos seus géis, com uso comercial em formulações de alimentos, de medicamentos e cosméticos, onde o seu material não é digerido pelo sistema digestório (PRAJAPATI et al., 2014).

Estevam et. al (2018) produziu o extrato de *G. birdiae* através do pó acrescentando água destilada e utilizou como modificador de textura de leite fermentado. Os autores identificaram que o resultado da firmeza do produto foi maior do que da gelatina, e que a macroalga não inibiu o crescimento dos microrganismos, evidenciando a sua aplicação biológica.

Com relação às propriedades biológicas atribuídas às carragenanas, a literatura relata a atividade anticoagulante e antitrombótica, antiviral (BUCK et al., 2006), anti-tumoral (HAIJIN; XIAOLU; HUASHI, 2003) imunomodulatória (ZHOU et al., 2004), antioxidante e anti-hiperlipidêmica (CAMPO et al., 2009; PRAJAPATI et al., 2014; WIJESEKARA; PANGESTUTI, 2011; MENDIS e KIM, 2011). Os benefícios à saúde com o consumo de biomassa de alga são atribuídos tanto em humanos como em animais, trazendo então a propriedade do alimento funcional (RAPOSO; MORAIS, 2015).

Torres (2017) realizou uma revisão dos artigos que relacionavam os polissacarídeos sulfatados e as atividades biológicas para o gênero *Gracilaria* entre 1980 a 2016. O resultado está demonstrado na figura 6.

**Figura 6.** Número de artigos publicados com atividades biológicas avaliadas para polissacarídeos sulfatados de espécies de *Gracilaria* entre 1980 a 2016.



Fonte: Torres, 2017

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar o potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao *Lactobacillus rhamnosus*.

#### 3.2 Específicos

- Analisar a composição nutricional da *G. birdiae* coletada.
- Avaliar a toxicidade *in vitro* da *G. birdiae*.
- Avaliar o crescimento bacteriano dos grupos testes com polissacarídeos de *G. birdiae*.
- Acompanhar o comportamento do pH ao final do cultivo e a sua relação com o crescimento bacteriano.
- Avaliar a atividade antimicrobiana de metabólitos do cultivo do *Lactobacillus rhamnosus* com *G. birdiae*.

#### 4. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali et al. Incorporation of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* into infant-foods inhibit proliferation of toxicogenic *Bacillus cereus* strains. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [s.l.], v. 18, p.101013-101043, mar. 2019.

AL-SHERAJI, Sadeq Hasan et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1542-1553, out. 2013.

Arora, K. A.; Pandove, M. G. Probiotics and its health benefits. **Journal of Global Biosciences**, v.3, n. 3, pp. 686-693, 2014.

AYRES-OSTROCK, L.M., MAUGER, S., PLASTINO, E.M., OLIVEIRA, M.C, VALERO, M., DESTOMBE, C. Development and characterization of microsatellite markers in two agarophyte species, *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria caudata* (Gracilariaceae, Rhodophyta), using next-generation sequencing. **J Appl Phycol**, p.28, n.1, p.653–662, 2016.

BARROS, Francisco C.n. et al. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 92, n. 1, p.598-603, jan. 2013.

BEZERRA, A.f.; MARINHO-SORIANO, E.. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 34, n. 12, p.1813-1817, dez. 2010.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, R.C. (org). et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. 2010.

BRAHE, L.K.et al. Dietary Modulation of the Gut Microbiota – a Randomised Controlled Trial in Obese Postmenopausal Women. **British Journal of Nutrition**, UK,v.114, n. 3, p. 406-17, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 abr. 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 abr. 1999.

BRASIL. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos – lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Brasília: Anvisa, 2008.

- BUCK, C. B.; THOMPSON, C. D.; ROBERTS, J. N.; MÜLLER, M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Carrageenan is a potent inhibitor of Papillomavirus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. 671-680, 2006.
- CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA JR., D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis– A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 167–180, 2009.
- CANELÓN, D. J.; CIANCIA, M.; SUÁREZ, A. I.; COMPAGNONE, R. S.; & MATULEWICZ, M. C. Structure of highly substituted agarans from the red seaweeds *Laurencia obtusa* and *Laurencia filiformis*. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 705-713, 2014.
- CARNEIRO, M. A. A. ; MARINHO-SORIANO, E. ; PLASTINO, E. M. . Phenology of an agarophyte *Gracilaria birdiae* Plastino and E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta) in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 317-322, 2011.
- CARVALHO FILHO, J. Algas – uma alternativa para as comunidades pesqueiras? **Panorama da Aqüicultura**, Rio de Janeiro, v.14, n.84, p.53-56, 2004.
- CHAN, P. T., MATANJUN, P., YASIR, S. M.; TAN, T. S. Antioxidant and hypolipidaemic properties of red seaweed, *Gracilaria changii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 2, p. 987–997, abr. 2014.
- CHAN, P. T.; MATANJUN, P. Chemical composition and physicochemical properties of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. **Food Chemistry**, v. 221, p. 302–310, 2017.
- CHEN, Michael X. et al. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. **Journal Of The Formosan Medical Association**, [s.l.], v. 118, p.10-22, mar. 2019.
- COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **The American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 1052-1059, 1999.
- CORZO, N.. Prebiotics: concept, properties and beneficial effects. **Nutricion Hospitalaria**, [s.l.], n. 1, p.98-118, 7 fev. 2015.
- DANNESKIOLD-SAMSØE, Niels Banhos et al. Interplay between food and gut microbiota in health and disease. **Food Research International**, [s.l.], v. 115, p.23-31, jan. 2019.
- DAWCZYNSKI, C., SCHUBERT, R., JAHREIS, G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. **Food Chemistry**, v.103, n.3, p. 891–899, 2007.

DHARGALKAR, V. K.; VERLECAR, X. C. Southern Ocean seaweeds: a resource forexploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, n. 1, p. 229-242, 2009.

ESTEVAM, A. C. T. et al. Effect of Aqueous Extract of the Seaweed *Gracilaria domingensis* on the Physicochemical, Microbiological, and Textural Features of Fermented Milks. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 4, p. C874–C880, 2016.

ESTEVAM, Adriana Carneiro Tavares et al. Aqueous extract of *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) as a texture modifier in fermented milks. **Lwt**, [s.l.], v. 90, p.418-423, abr. 2018.

EUROMONITOR INTERNACIONAL, *Consumers, Portuguese, Top 10 Global Consumer Trends, Top 10 Global Consumer Trends, 2019*. Acesso: <https://blog.euromonitor.com/de-volta-ao-basico-uma-tendencia-de-consumo-em-alimentos-e-bebidas-no-brasil/>

FERREIRA, S. S., PASSOS, C. P., MADUREIRA, P., VILANOVA, M., COIMBRA, M. A. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, 132, 378–396, 2015.

FIDELIS, G. P. Otimização da extração de polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Gracilaria birdiae* e análise da atividade anticoagulante e antioxidante. 2014. Dissertação de mestrado–Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**. Bethesda, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GÓMEZ ORDÓÑEZ E. 2013. Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 238p. 2013.

GRESSLER V, et. al., Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v.120, n. 2, p.585–590, 2010.

HAIJIN, M.; XIAOLU, J.; HUASHI, G. A κ-carrageenan derived oligosaccharide prepared by enzymatic degradation containing anti-tumor activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 297–303, 2003.

HAYASHI L, BULBOA C, KRADOLFER P, SORIANO G, ROBLEDO D. Cultivation of red seaweeds: A Latin American perspective. **J Appl Phycol** v.26, n.2, p. 719–727, 2014.

HOLDT, S. L.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 543-597, 2011.

IBERAGAR. Agar ou agar-agar, o mais antigo ficocolóide. **Aditivos & Ingredientes**, v. 1, n. 1, p. 31-39, 2010.

LELIS, F.C.L. Avaliação do crescimento da alga marinha *Gracilaria birdiae*, (Gracilariales, Rhodophyta), cultivada em estrutura long line. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 74 p, Fortaleza, 2006.

LIU, Jinghua et al. Prebiotic effects of diet supplemented with the cultivated red seaweed *Chondrus crispus* or with fructo-oligo-saccharide on host immunity, colonic microbiota and gut microbial metabolites. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.15-279, 14 ago. 2015.

LIU, Lu et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the antioxidant activity of Cheddar cheese during ripening and under simulated gastrointestinal digestion. **Lwt**, [s.l.], v. 95, p.99-106, set. 2018.

MARINHO-SORIANO, E.; PINTO, E.; YOKOYA, N. S.; COLEPICOLO, P.; TEXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. . Frontiers on algae bioactive compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p.1-1, 2011.

MENDIS, ERESHA; KIM, SE-KWON. Present and Future Prospects of Seaweeds in Developing Functional Foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 64, p. 1-15, 2011.

MILLEDDGE, J.J.; NIELSEN, B.V.; BAILEY, D. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v.15, p. 67, 2016.

MORAES, F. P; COLLA, L. M. / **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

NAVARRO-GONZÁLEZ, Inmaculada; PERIAGO, María Jesús. El tomate, ¿alimento saludable y/o funcional? **Revista Española de Nutrición Humana y Dietética**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.323-335, 31 dez. 2016.

OLIVEIRA, C. S. D. Prospecção de compostos bioativos nas macroalgas *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* e *Undaria pinnatifida*. 2015. Tese de Doutorado-Universidade de Aveiro, 2015.

OLVEIRA, Gabriel; GONZÁLEZ-MOLERO, Inmaculada. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. **Endocrinología y Nutrición**, [s.l.], v. 63, n. 9, p.482-494, nov. 2016.

ORIACH, Clara Seira et al. Food for thought: The role of nutrition in the microbiota-gut–brain axis. **Clinical Nutrition Experimental**, [s.l.], v. 6, p.25-38, abr. 2016.

PEREIRA, D. C.; TRIGEIRO, T. G.; COLEPICOLO, P.; MARINHO-SORIANO, E. Seasonal changes in the pigment composition of natural population of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 874-880, 2012.

PIRES, V. C. F.; CALADO, C. M. B.; SANTOS, K. M. de A. Dos.; ALBUQUERQUE, A. P.; FLORENTINO, E. R. Caracterização físico-química da macroalga *Gracilaria birdiae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 52., 2012, Recife. Trabalho. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, 2012. v. 1, p. 1 - 1.

PRAJAPATI, V. D.; MAHERIYA, P. M.; JANI, G. K.; SOLANKI, H. K. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydrate polymers**, v. 105, p. 97- 112, 2014.

RAMNANI, Priya et al. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. **Anaerobe**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.1-6, fev. 2012.

RAPOSO, M. F.J.; MORAIS, A. M. M. B. Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke. **Life Sciences**, [s.l.], v. 125, p.32-41, mar. 2015.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Ed. 7, p. 830, 2007.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

RUPÉREZ, P.; ORDÓÑEZ, E. V.; JIMÉNEZ, A. Biological Activity of Algal Sulfated and Nonsulfated Polysaccharides. **Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources**. Ed. Miguel Herrero, 2013.

SAKTHIVEL, R.; PANDIMA DEVI, K. Evaluation of physicochemical properties, proximate and nutritional composition of *Gracilaria edulis* collected from Palk Bay. **Food Chemistry**, v. 174, p. 68–74, 2015.

SANTOS JÚNIOR et al. Viabilidade econômica de um produto a base de algas da associação de maricultoras do litoral Norte Potiguar. **Pubvet**, v.11, n.4, p.313-319, Abr., 2017.

SCHULTZ MOREIRA, A. R. Derivados cárnicos con algas: implicaciones sobre el metabolismo lipoproteico, estatus antioxidante y protección hepática. 2014. Tese de Doutorado-Universidad Complutense de Madrid, 2014.

SOUZA, et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v.27, n.2, p. 287-292, 2012.

SOUZA, V.M.C.; SANTOS, E.F.; SGARBIERI, V.C. The Importance of Prebiotics in Functional Foods and Clinical Practice. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p.133-144, 2011.

TABARSA, M. et al. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. **Journal Science Food Agriculture**, v. 92, n.12, p. 2500-2506, 2012.

TEIXEIRA, L. S. Avaliação nutricional dos tubérculos de plantas alimentícias não convencionais amazônicas. 2015. Tese de Doutorado. 99f, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2015.

TORRES, P. B., Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies nativas de *Gracilaria* de importância econômica. Tese de doutorado. 288f, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

TSENG, C. K. Algal biotechnology industries and research activities in China. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 375–380, 2001.

TURRA, Alexander et al. Environmental impact assessment under an ecosystem approach: THE SÃO SEBASTIÃO HARBOR EXPANSION PROJECT. **Ambiente & Sociedade**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.155-176, set. 2017.

URSI, S. et al. Intraspecific variation in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): growth, and agar yield and quality of color strains under aquaculture. **Botânica Marina**, v. 56, p. 241–248, 2013.

VASCONCELOS, B. M. F.; GONÇALVES, A. A. Macroalgas e seus usos: alternativas para as indústrias brasileiras. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 125-140, 2013.

VIANA, Marcia Regina et al. A racionalidade nutricional e sua influência na medicalização da comida no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.447-456, fev. 2017.

VIUDA-MARTOS, M., LÓPEZ-MARCOS, M. C., FERNÁNDEZ-LOPEZ, J., SENDRA, E., LÓPEZVARGAS, J. H., & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Role of fiber in cardiovascular diseases: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, n. 2, p. 240–258, 2010.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14–21, 2011.

WÜSTENBERG, T. General Overview of Food Hydrocolloids. **Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food industry Fundamentals and Applications**, p. 1–68, 2015.

YADAV, R. et al. Microbial Pathogenesis Evaluation of anti-diabetic attributes of *Lactobacillus rhamnosus* MTCC : 5957 , *Lactobacillus rhamnosus* MTCC : 5897 and *Lactobacillus fermentum* MTCC : 5898 in streptozotocin induced diabetic rats. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, n. July, p. 454–462, 2018.

YANG, Y. et al. Cultivation of seaweed *Gracilaria* in Chinese coastal waters and its contribution to environmental improvements. **Algal Research**, v. 9, p. 236–244, 2015.

Yasmin, A.; Butt, M. S.; Afzaal, M.; Baak, M. V.; Nadeem, M. T.; Shahid, M. Z. Prebiotics, gut microbiota and metabolic risks: Unveiling the relationship. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 189-201, 2015.

YOW, Y.Y; LIM, P.E; PHANG, S.M. Genetic diversity of *Gracilaria changii* (*Gracilariaceae*, *Rhodophyta*) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox1* gene analysis. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p.219-226, 2011.

ZAPOROZHETS, T. S. et al. The prebiotic potential of polysaccharides and extracts of seaweeds. **Russian Journal Of Marine Biology**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.1-9, jan. 2014.

ZHANG, et. al., Microwave-Assisted Degradation of Polysaccharide from *Polygonatum sibiricum* and Antioxidant Activity. **Journal of Food Science**. V. 0, mar. 2019.

ZHOU, G.; SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 47–53, 2004.

## 5. CAPÍTULO 1

### 5.1 Artigo 1

# Potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao *Lactobacillus rhamnosus*

**Condição:** A ser submetido

**Periódico:** *Journal of Food Science*

Qualis B1 para Medicina veterinária



## RESUMO

Prebióticos são alimentos funcionais que auxiliam no crescimento de microorganismos benéficos, promovendo benefícios à saúde. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao *Lactobacillus rhamnosus*. A *G. birdiae* foi adquirida em forma de pó pela Associação de Maricultoras do Rio do Fogo – RN. Com o pó de *G. birdiae* foi analisado a composição nutricional e foi avaliado a sua toxicidade *in vitro*. Foram extraídos os polissacarídeos da *G. birdiae*, com água e precipitados com etanol e utilizados em três grupos testes, para análise como prebiótico nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, e com posterior medição do pH. Do líquido metabólico de melhor crescimento foi analisada a atividade antimicrobiana na inibição das bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. O resultado revelou que não foi apresentada toxicidade com o pó de *G. birdiae*. O resultado que melhor apresentou células viáveis foi o do grupo teste de 0,50% de *G. birdiae*, que obteve  $3,07 \times 10^8$  UFC/ml no crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* no tempo de 72 horas. O pH foi mantido ácido na média de  $5,7 \pm 0,14$ . O líquido metabólico do cultivo com *G. birdiae* não inibiu o crescimento das bactérias investigadas. Os polissacarídeos de *G. birdiae* foram eficientes no crescimento da bactéria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* e mantiveram a resistência em meio ácido, revelando efeito prebiótico, onde poderá favorecer a saúde a partir do seu consumo direto, ou como aditivo na produção de novos alimentos.

**Palavras-chave:** Polissacarídeos. Probiótico. Alimentos funcionais. Aditivos alimentares. *Rhodophyta*.

## Introdução

O microbioma intestinal desempenha um papel importante na saúde e em várias doenças. A manutenção das suas condições saudáveis traz, portanto benefícios ao seu hospedeiro. Sendo os prebióticos a fonte de energia para as bactérias benéficas, estudos relacionam os alimentos ricos em fibras e determinados polissacarídeos com potencial efeito prebiótico (OLVEIRA; GONZÁLEZ-MOLERO, 2016).

Os prebióticos são constituintes alimentares não digeríveis, mas que são utilizados seletivamente como combustível para micro-organismos benéficos, os probióticos, que ao se alimentar deste o fermentam, produzindo benefícios para a saúde do hospedeiro, e mantendo a microbiota saudável (MOHANTY et al., 2018).

Os gêneros probióticos mais utilizados são o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*, regularmente utilizados em suplementação (DALIRI et al., 2015) e entre os prebióticos mais utilizados estão a inulina e o fruto-oligossacarídeo (FOS) (AL-SHERAJI et al., 2013). Estes alimentos funcionais são responsáveis por movimentar um mercado promissor pela indústria e população que vem buscando a qualidade dos alimentos consumidos, visando à longevidade (SILVA e SÁ, 2012).

Ramnani et al. (2012) em ensaio *in vitro* com a macroalga do filo *Rhodophyta* *Gracilaria* spp. identificou que as bactérias da microbiota intestinal fermentaram a macroalga com produção significativa de ácidos graxos de cadeia curta, do tipo acetato e propionato. O achado sugere que a alga pode ter um potencial efeito prebiótico, e ser um alimento funcional.

O gênero *Gracilaria* tem significativa importância econômica em vários países devido ao seu conteúdo de ágar e crescimento rápido (BEZERRA; MARINHO-SORIANO, 2010). Estudos com espécies de *Gracilaria* evidenciaram benefícios à saúde, como potencial efeito antioxidante e imunomodulador (DI et al., 2017; GUARATINI et al., 2012). Liu et al. (2016) em estudo com camundongos encontrou funções antialérgicas e também imunomoduladora. Isso se deve principalmente a fibra dietética presente em grande quantidade nas macroalgas que promovem o crescimento de micro-organismos benéficos e protegem a microbiota intestinal (SUNDARAM, PATRA, MANIARASU, 2012).

Das espécies de *Gracilaria* a *G. birdiae* é uma das mais importantes sendo amplamente cultivada no litoral do nordeste brasileiro, principalmente no Rio Grande do Norte, Ceará e Paraíba, por conta da temperatura da água e condições climáticas (TABARSA, et al., 2012; COSTA; PLASTINO, 2011). Essa macroalga foi descrita por Plastino e Oliveira (2002) e é objeto de estudo devido a sua composição nutricional, rica em proteínas e fibras e dos seus polissacarídeos sulfatados, utilizados na indústria alimentícia como espessante, estabilizante e geleificantes (ALENCAR et

al., 2019; ESTEVAM et al., 2018). Sendo assim, o objetivo foi avaliar o potencial prebiótico de alga *Gracilaria birdiae* frente ao *Lactobacillus rhamnosus*.

## **Material e Métodos**

### **Macroalga *Gracilaria birdiae***

A macroalga *Gracilaria birdiae* foi adquirida em pó pela Associação das Maricultoras de Algas de Rio do Fogo (AMAR), localizada em Rio do Fogo, estado do Rio Grande do Norte.

### **Composição físico-química**

As análises para determinação dos teores de umidade, sólidos totais, cinzas, lipídios, proteína total, açúcares totais, pH e acidez titulável foram realizadas no Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP), que seguiu a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) para análise da *G. birdiae* pó seco.

### **Toxicidade *in vitro***

As células utilizadas foram Macrófagos (J774.A1) e HEK-293 (Células embrionárias renais) obtidas de Silva et al (2019) que foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com soro fetal bovino (10%) e penicilina-estreptomicina (1%) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram contabilizadas em câmara de newbauer para o teste de viabilidade celular.

O pó de *G. birdiae* nas concentrações finais de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL foi solubilizado em DMSO a 1% para a produção do extrato.

O ensaio de MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide) foi utilizado para determinar a viabilidade celular do extrato (MOSSMAN, 1983). Os macrófagos a 1x10<sup>5</sup> células/mL e HEK a 1x10<sup>4</sup> células/mL foram inoculadas em placas de 96 poços. Após 24h de incubação foram expostas ao extrato da *G. birdiae* durante 24 e 48 horas. Após o período de tratamento, 20 µL de solução de MTT (4mg/mL) foi adicionado em cada poço, e as placas foram incubadas durante 2h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionados 100 µL de DMSO (Dimethylsulfoxide). A leitura da absorbância foi

realizada em Leitor de Microplaca (Biotek Elx808) 630 nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular:  $(A_{bs} \text{ da população celular tratada} \times 100 / A_{bs} \text{ da população celular não tratada})$  (SANTOS et al., 2005).

### **Extração de polissacarídeos do pó de *Gracilaria birdiae***

Os polissacarídeos foram extraídos de acordo com a metodologia de Teixeira et al., (2016) por diluição em água (1:100 m/v) seguido por ebulição a 100°C durante 1 hora, sob agitação constante. A precipitação dos polissacarídeos foi realizada usando 80% de etanol (1:1 v/v), durante 24 horas, em temperatura de 1°C sob refrigeração. A separação do precipitado foi feita por centrifugação Sigma® por 3 minutos sob 4000 G, em temperatura média de 26°C, descartando o sobrenadante. As fibras precipitadas foram submetidas a lavagens sucessivas, primeiro com 80% de etanol, em seguida, água destilada. No final, as fibras recuperadas foram liofilizadas, onde foi obtido rendimento de 35%. O método de extração com água e precipitação de etanol tem sido relatado como um método eficaz para o uso de polissacarídeos (ZHANG, et. al., 2019).

### **Micro-organismo**

*Lactobacillus rhamnosus* foi obtido a partir de Lima et al. (2017), através de grão de Kefir fermentado com leite de ovelha, armazenado no Laboratório de Bioativos (LABTECBIO) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Recife, Brasil). A bactéria foi mantida estocada em leite desnatado reconstituído (LDR) e 10% de glicerol sob 4°C. Para uso, as culturas foram reativadas por duas vezes em LDR a 10%, e em seguida em Man-Rogosa-Sharpe (MRS) e incubadas a 37°C durante 24h entre as reativações.

### **Meio de cultura utilizado para o crescimento do *Lactobacillus rhamnosus***

O meio de cultura utilizado foi o MRS com modificações, onde a glicose foi substituída pelos polissacarídeos de *Gracilaria birdiae* em diferentes concentrações para avaliar o efeito prebiótico, formando o grupo teste (SÁNCHEZ-ZAPATA et al.,

2013; SOUSA et al., 2015). A base da composição dos diferentes meios de cultivo foi a do MRS: bacto protease peptona 10 g/L, extrato de carne 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, fosfato di-potássio anidro 2 g/L, Tween 80 1 g/L, acetato de sódio 5 g/L, citrato de amônio dibásico 2 g/L, sulfato de magnésio 0,1 g/L, sulfato de manganês 0,05 g/L, e a sua respectiva fonte de carbono em 3 concentrações.

Para o controle foi utilizado o MRS com o prebiótico inulina (Duofiber Roval®), na substituição da glicose e como controle negativo o MRS sem glicose. Os meios foram esterilizados a 125°C por 15 minutos para serem utilizados na avaliação do potencial prebiótico.

O delineamento experimental dos meios para crescimento está na tabela 1.

**Tabela 1.** Delineamento experimental dos meios de cultura para crescimento do *Lactobacillus rhamnosus*

Grupo teste	Grupo controle	Grupo negativo
MRS + <i>G. birdiae</i> 0,5%	MRS + Inulina 0,5%	MRS sem glicose
MRS + <i>G. birdiae</i> 1,25%	MRS + Inulina 1,25%	
MRS + <i>G. birdiae</i> 2%	MRS + Inulina 2%	

### Avaliação da atividade prebiótica

O crescimento do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* com os respectivos meios de cultura foi determinado pela metodologia descrita por Saminathan et al. (2011) com adaptações, onde a biomassa foi avaliada por meio da contagem de células viáveis (UFC por mg ou mL).

Para tanto, 1 mL da alíquota de suspensões da cepa de *Lactobacillus rhamnosus* (contagem final de células viáveis de aproximadamente 5 log UFC/mL) foi inoculada em frascos estéreis contendo 20 mL dos diferentes tratamentos do desenho experimental. As misturas foram suavemente agitadas manualmente durante 30s, e subsequentemente incubadas de forma estática sob condições de aerobiose a 37°C e em triplicata. O experimento foi realizado em diferentes intervalos de tempo de incubação (0 - apenas depois da homogeneização, 24, 48, 72 h de após incubação). Após o tempo do cultivo alíquotas do meio foram

plaqueadas por espalhamento em superfície (*spread-plate*). As placas foram incubadas aerobicamente a 37 °C durante 24 h, e os resultados foram expressos como log<sub>10</sub> UFC/ mL.

A cada 24 horas foram retiradas alíquotas do cultivo e centrifugadas a 4000 G por 5 minutos, e o sobrenadante utilizado para determinação do pH.

### **Avaliação da atividade antimicrobiana**

Os micro-organismos utilizados para determinar a atividade antimicrobiana incluíram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. O pré-inóculo para cada estirpe padrão foi preparado em caldo Brain Heart Infusion (Himedia®, Mumbai, Índia). As estirpes foram aerobicamente incubadas a 37°C durante 18 h.

A concentração de biomassa das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram determinadas medindo-se a turbidez da suspensão a 600 nm (Microplate Lector LM-LGC, LGC Biotecnologia Ltda., São Paulo, Brasil) e depois convertido em unidades formadoras de colônias ( $1,5 \times 10^8$  UFC / mL).

Os experimentos foram realizados segundo Pritchard; Phillips; Kailasapathy (2010) em Microplaca de 96 poços, onde foram adicionados 50 µL do líquido metabólico resultante do cultivo contendo *G. birdiae* e *Lactobacillus rhamnosus* e 50 µL do micro-organismo teste em triplicata. A microplaca foi incubada por 24 h a 37°C. O crescimento bacteriano foi monitorado pela leitura em 600 nm. O resultado foi calculado a partir do controle positivo (com bactéria) e do controle negativo (só meio de cultura) em percentual de inibição

### **Analises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas Programa *GraphPad* Prisma 5.0, onde se fez média e desvio padrão  $p < 0,05$  e correlação de Pearson. Para a toxicidade utilizou-se da ANOVA seguido pelo teste *Bonferroni* para determinação de diferenças estatísticas entre os grupos de amostras.

## Resultados e discussão

### Composição físico-química da macroalga *Gracilaria birdiae*

Há milênios os povos orientais possuem o hábito do consumo de macroalgas marinhas na sua rotina alimentar, chegando até 20% da quantidade diária de alimentos da população. Isso se deve também aos compostos bioativos e componentes nutricionais presentes (VASCONCELOS e GONÇALVES, 2013).

A macroalga *G. birdiae* é uma das espécies mais exploradas dos bancos naturais no Brasil, possui uma rica composição nutricional que atrai para o seu consumo. Os resultados médios da composição do pó de *Gracilaria birdiae* obtidos no estudo estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2. Composição físico-química do pó de *Gracilaria birdiae***

Parâmetro	Resultados	Unidade
Acidez em alimentos	3,17	g/100g
Açúcares totais	5,27	g/100g
Cinzas	8,7	g/100g
Lipídios	0,085	g/100g
pH	6,9	-
Proteína total	4,15	g/100g
Sólidos totais (matéria seca)	87,9	g/100g
Umidade	12,1	g/100g

Os valores de pH para o pó da *G. birdiae* evidenciam neutralidade, de modo semelhante ao resultados de Estevam et al. (2018) para o mesmo tipo de macroalga. Esse resultado auxilia o seu consumo e uso na formulação de produtos alimentícios. O teor de umidade 12,1g encontrado neste estudo para a alga *G. birdiae* também foi próximo ao valor de 13,42g encontrado por Estevam et al. (2018).

O teor de cinzas encontrado para a *G. birdiae* seca 8,7% foi próximo aos valores citados por Gomes (2018) 7,73%, e diferentes resultados foi relatado por Vasconcelos (2015), que obteve valores menores para *G. birdiae*. No gênero *Gracilaria* os minerais encontrados em maior proporção são o potássio, cálcio, sódio e magnésio, importantes para consumo na dieta (KRISHNAIAH et al., 2008).

Valores de proteínas encontrados por Gomes (2018) 3,31% foram semelhantes ao presente estudo. Segundo Torres (2017) os valores se assemelham ao dos alimentos cereais, e apesar de ficarem abaixo dos valores encontrados em leguminosas, representam boas fontes proteicas.

O gênero *Gracilaria* geralmente apresenta uma quantidade de lipídios pequena abaixo de 1%, representando a menor fração na composição do alimento. No presente estudo foram encontrados 0,085g/100g, corroborando com o estudo Estevam et al (2018), que também obteve a menor fração da composição com os lipídios, onde encontrou 0,33g, e resultados semelhantes foram encontrados na análise da *G. domingensis* (ESTEVAM et al., 2016). No entanto, discordando com os achados Vasconcelos (2015), encontrou valores mais altos para os lipídios (4,05%) para *G. birdiae*. Mesmo em baixas concentrações os lipídios presentes na alga são ricos em ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, onde a *G. birdiae* é rica em ácido araquidônico, que apresentam benefícios à saúde (TABARSA et al., 2012).

Faz-se necessário ressaltar que a composição química e nutricional das algas depende de muitos fatores, incluindo espécies, origem geográfica ou área de cultivo, variações sazonais, ambientais e fisiológicas, época da colheita, temperatura da água e métodos de processamento e métodos analíticos (DAWCZYNSKI; SCHUBERT; JAHREIS, 2007).

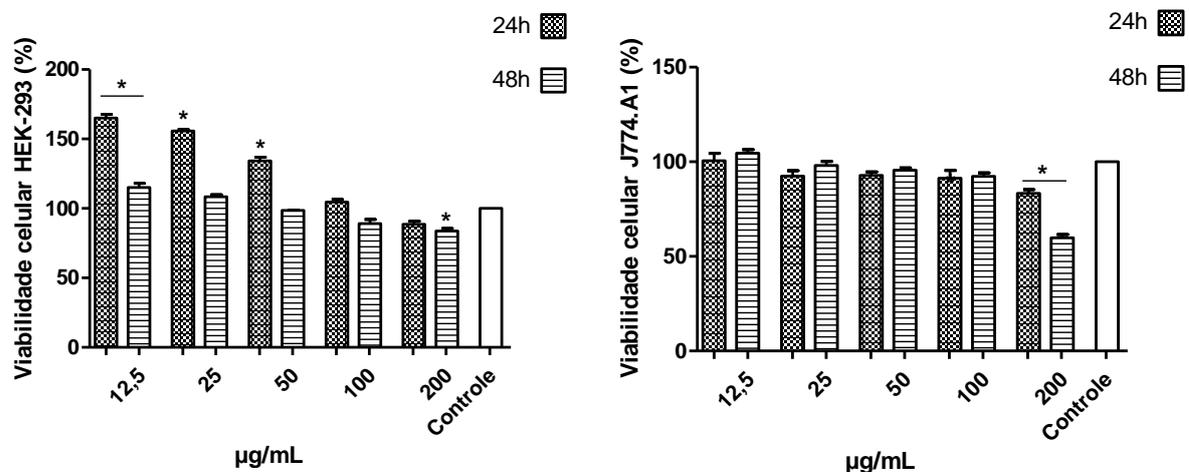
Portanto, por possuir baixa caloria e boa oferta de nutrientes a *G. birdiae* pode ser considerada como bom suplemento nutricional. Estudos tem sido realizados para incentivo do consumo de *G. birdiae* na alimentação brasileira com na produção de bolo e biscoito (JÚNIOR, 2018) e como modificador de textura em sobremesa láctea (ESTEVAM et al., 2017).

## Toxicidade

As linhagens celulares J774.A1 e HEK-293 utilizadas no experimento são importantes no fornecimento de informações de alterações ou toxicidade nos rins e sistema imunológico, mesmo para ensaio *in vitro* (SILVA et al., 2019). Neste estudo os resultados mostraram que a *G. birdiae* não apresentou toxicidade em todas as concentrações, e que a viabilidade celular estava acima de 80% nos intervalos de 24

e 48 horas para HEK-293 e J774.A1. Apesar da viabilidade celular ser reduzida no experimento com 200 µL do pó de *G. birdiae* para J774.A1 no período de 48 horas, este não comprometeu o resultado final (Figura 1).

**Figura 1.** Viabilidade celular do extrato em HEK-293 e J774.A1 para análise da toxicidade *in vitro* de *G. birdiae*. Diferenças estatísticas com controle foram determinadas pela ANOVA seguido de Bonferroni, \*P < 0,05. Cada valor determina a média±SD de três experimentos independentes. Cada experimento em quadruplicata.



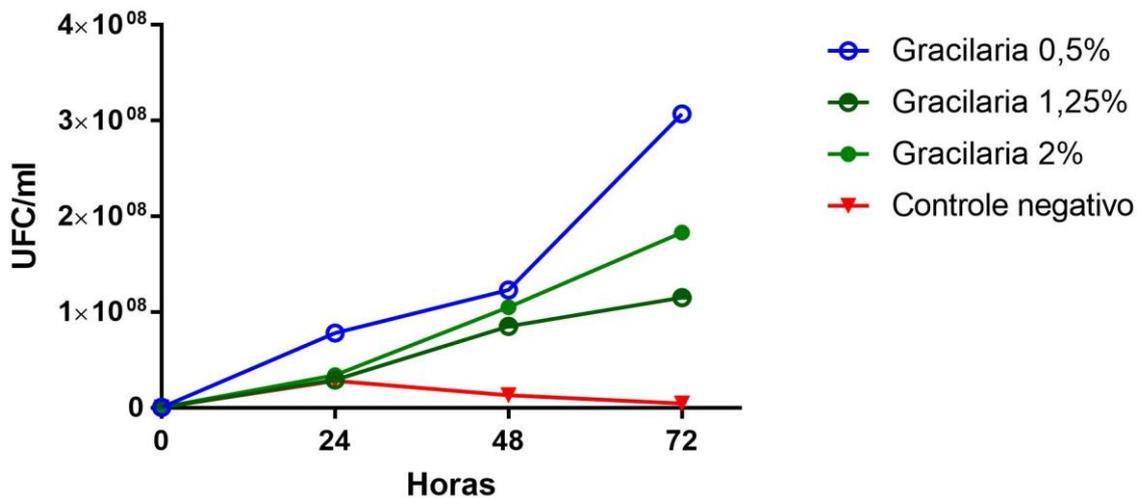
Oliveira (2014) ao verificar a citotoxicidade de galactanas de *G. birdiae* com linhagens celulares de HEK-293 também, verificou que não se era tóxico, corroborando com os achados deste estudo.

A manutenção da viabilidade celular e a proximidade com o controle negativo representa a ausência da toxicidade, esses achados se mostram interessantes, pois permite o uso da macroalga *G. birdiae* na alimentação, sendo importante ressaltar que já há o seu consumo na alimentação.

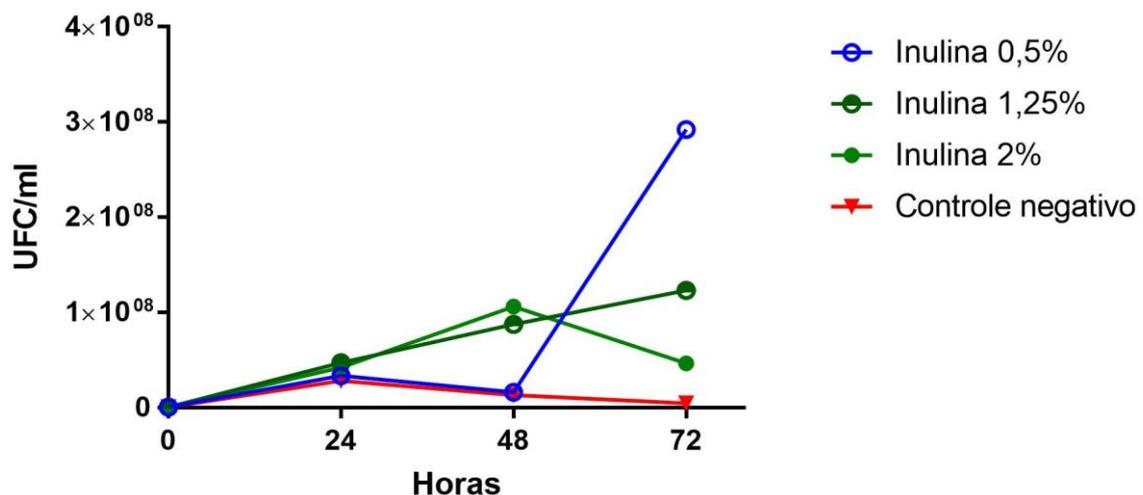
#### Atividade prebiótica

As análises realizadas com o grupo teste mostraram crescimento do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* em todas as concentrações de *G. birdiae* e com crescimento similar ao evidenciado pelo grupo controle, como pode ser verificado na figura 2 e 3.

**Figura 2.** Crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* com meio contendo MRS sem glicose, com acréscimo de *G. birdiae* (grupo teste) em concentrações de 0,5%, 1,25% e 2%, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.



**Figura 3.** Crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* com meio contendo MRS sem glicose, com acréscimo de Inulina (grupo controle) em concentrações de 0,5%, 1,25% e 2%, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.



O grupo negativo estimulou um pequeno crescimento do probiótico nas primeiras 24 horas, e após o período foi se obtendo o declínio da população, haja vista a ausência da glicose, fonte principal energética.

Os maiores efeitos promotores de crescimento em *L. rhamnosus* durante o período de incubação de 72 horas foram observados no grupo teste contendo *G. birdiae* (0,5%), seguido por meio do grupo controle contendo inulina (0,5%). Hu et al. (2006) também encontraram aumentos do número de *Lactobacillus in vitro*, com melhores efeitos que os de frutooligosacarídeos (FOS) em um grupo de prebióticos

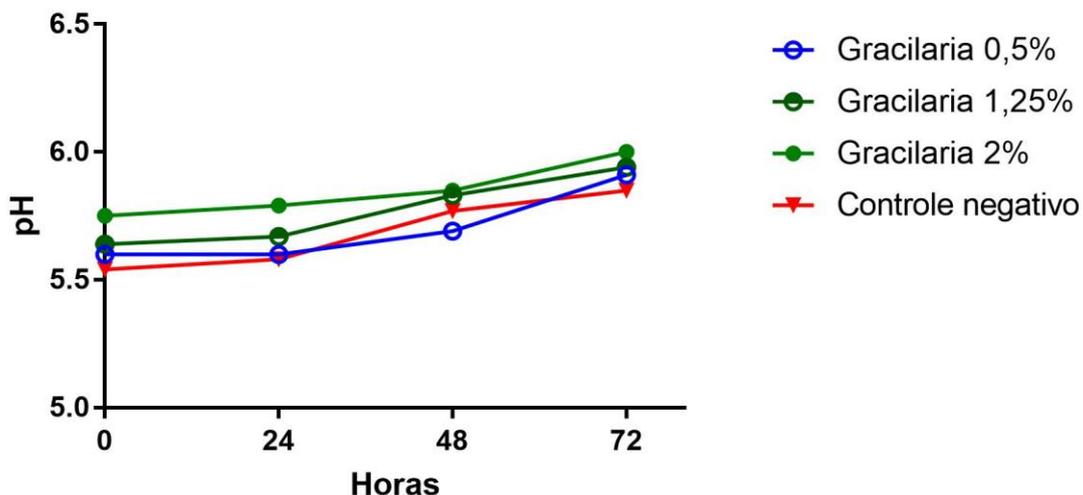
estudados com polissacarídeos alginatos. Sims (2014) analisou o efeito prebiótico de *L. rhamnosus* com inulina e encontrou melhores resultados com a adição de 1% após 48 horas.

Concentrações de 1,25% e 2% de polissacarídeos de *G. birdiae* estimularam o crescimento do probiótico, mas em menores proporções, o que pode ser explicado pela assimilação dos carboidratos complexos e a capacidade de hidrólise das ligações (BARRANGOU et al., 2003).

As cepas de *L. rhamnosus* mostraram contagem de células viáveis sem diferença estatística segundo a correlação de Pearson em meio contendo como fonte de carbono a *G. birdiae* e a inulina, apresentando taxas elevadas no final do período de incubação 8 log UFC/ml na concentração de 0,5%. Isso demonstra que o uso dos polissacarídeos pode ser uma ótima alternativa ao uso da inulina como prebiótico, favorecendo os maricultores que dependem da macroalga para a subsistência, estimulando o consumo de um produto regional.

A medida que ocorreu o crescimento celular, o pH se manteve ácido na média de  $5,7 \pm 0,14$ , como pode ser verificado na figura 4. Essa manutenção se dá devido às características do micro-organismo produtor de ácidos, e que é importante para a manutenção de uma microbiota saudável (WAGNER et al., 2018).

**Figura 4.** Acompanhamento do pH frente ao crescimento do *Lactobacillus rhamnosus* com meio teste contendo MRS sem glicose, com acréscimo de *G. birdiae* em concentrações de 0,5%, 1,25% e 2%, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas.



O pH da *G. birdiae* é próximo a neutralidade, bem como a inulina o que favorece o crescimento de cepas probióticas, onde se nota estímulo em valores de pH entre 6 e 7 (PIMENTEL e FRANCKI, 2005). Efeitos semelhantes foram encontrados na literatura, a exemplo de um estudo que buscou uma possível ação prebiótica do extrato de *Arthrospira platensis* em um fermentado lácteo contendo *Lactobacillus casei*, (PARADA et al., 1998) onde o material filtrado promoveu uma melhora no crescimento, quando adicionado a meio MRS, em pHs 6,3 e 7,0.

#### Atividade antimicrobiana de *G. birdiae*

A atividade antimicrobiana foi realizada com o líquido metabólico do maior crescimento bacteriano. Portanto, o escolhido para análise foi o cultivo do grupo teste que continha *G. birdiae* 0,5% na concentração total do meio do MRS sem glicose, do tempo de 72 horas.

Os resultados apontaram que não houve inibição no crescimento microbiano das espécies de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Uma explicação possível para as bactérias gram-negativas, como a *E. Coli* é que estas são resistentes à ação de bacteriocinas produzidas por bactérias *Lactobacillus*, como é o caso da bactéria do estudo, devido à barreira física oferecida pela membrana externa, mas que podem ser rompidas quando expostas a pH baixo (BELFIORE et al, 2007).

#### Conclusão

A macroalga *G. birdiae* é um produto regional disponível na costa brasileira, apresentou baixa quantidade de lipídios e boa oferta de proteínas, e não constatou toxicidade, seus polissacarídeos revelaram um efeito prebiótico, pois estimularam o crescimento da bactéria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* e sua viabilidade e se manteve nas condições de pH ácido. O seu líquido metabólico não apresentou atividade antimicrobiana para *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 .

Sendo assim os polissacarídeos de *G. birdiae* se apresentaram como promissores no crescimento probiótico e em baixas concentrações, se revelando como uma boa alternativa economicamente para a sua utilização pela indústria, e em contrapartida estimula os produtores e a manutenção das costas.

## Referências

ALENCAR RB, et al. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p. 279-284, jul./dez., 2003.

ALENCAR, Poliana O. Cavalcante et al. A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: In vitro and in vivo activities. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 90, p.28-34, maio 2019.

AL-SHERAJI, Sadeq Hasan et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1542-1553, out. 2013.

BARRANGOU, R. et al., Functional and comparative genomic analyses of na operon involved in frutooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p.8957-8962, 2003.

BELFIORE, C et al., Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 223-229, 2007.

BEZERRA, A.f.; MARINHO-SORIANO, E.. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass And Bioenergy**, [s.l.], v. 34, n. 12, p.1813-1817, dez. 2010.

BROCK, T. D., MADIGAN M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J., 1994. Biology of microorganisms. **Prentice-Hall International**, Inc., New York. 909pp.

COSTA, V. L.; PLASTINO, E. M. Color inheritance and pigment characterization of red (wild- type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology** , v. 23, p.599-605, 2011.

DALIRI, Eric Banan-mwine et al. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science And Human Wellness**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.56-65, jun. 2015.

DAWCZYNSKI, C., SCHUBERT, R., JAHREIS, G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. **Food Chemistry**, v.103, n.3, p. 891–899, 2007.

DI, T. et al. Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 64–75, 2017.

ESTEVAM, A. C. T et al. Effect of Aqueous Extract of the Seaweed *Gracilaria domingensis* on the Physicochemical, Microbiological, and Textural Features of Fermented Milks. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 4, p. C874–C880, 2016.

ESTEVAM, A. C. T. **Avaliação do comportamento de probióticos em base láctea utilizando algas do filo Rhodophyta**. 2016. 222 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

ESTEVAM, Adriana Carneiro Tavares et al. Aqueous extract of *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira) as a texture modifier in fermented milks. **Lwt**, v. 90, p.418-423, abr. 2018.

ESTEVAM, Adriana Carneiro Tavares et al. Comparison of dairy desserts produced with a potentially probiotic mixed culture and dispersions obtained from *Gracilaria birdiae* and *Gracilaria domingensis* seaweeds used as thickening agents. **Food & Function**, v. 8, n. 9, p.3075-3082, 2017.

GOMES, J. A. C. B. **Alga marinha *Gracilaria birdiae*: avaliação de atividades biológicas in vivo e in vitro e utilização em preparações culinárias**. 2018. 110 f. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

GUARATINI, T. et al. Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 4, p. 724–729, 2012.

HERIGSTAD, B; HAMILTON, M; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p.121–129, 2001.

IAL. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4th ed. São Paulo, Brazil: Instituto Adolfo Lutz. 1020 p.

JÚNIOR, T. A. G., **Utilização da macroalga *gracilaria birdiae* (greville) na alimentação humana**. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

KRISHNAIAH et al., Mineral Content of Some Seaweeds from Sabah's South China Sea. **Asian Journal of Scientific Research**, 1, p. 166-170, 2008.

LEIGHTON. T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LIMA, Meire dos Santos Falcão de et al. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.446-455, 28 dez. 2017.

MOHANTY, Debapriya et al. Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. **Food Bioscience**, [s.l.], v. 26, p.152-160, dez. 2018.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity. **Journal Immunology Methods**, 65: 55-63, 1983.

OLIVEIRA, L. C. B. P. **Propriedades bioativas dos polissacarídeos sulfatados da alga comestível *Gracilaria birdiae***. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

OLIVEIRA, Gabriel; GONZÁLEZ-MOLERO, Inmaculada. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. **Endocrinología y Nutrición**, [s.l.], v. 63, n. 9, p.482-494, nov. 2016.

PEHRSON, M. E. S. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus sp.* que apresentam propriedades probióticas.** 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

PIMENTEL CV de MB, FRANCKI VM, GOLLUCKE APB. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos.** São Paulo: Livraria Varela; 2005.

PLASTINO, E.M.; OLIVEIRA, E.C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v.41, p.4, p. 389-396, 2002.

PRITCHARD, Stephanie Rae; PHILLIPS, Michael; KAILASAPATHY, Kasipathy. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. **Food Research International**, [s.l.], v. 43, n. 5, p.1545-1548, jun. 2010.

RAMNANI, P. et al. In vitro fermentation and prebiotic potential of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2012.

SAMINATHAN, M. Et al. Effect of prebiotic oligosaccharides on growth of *Lactobacillus starins* used as a probiotic for chickens. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n.1, p. 57-64, 2011.

SÁNCHEZ-ZAPATA, E; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J; PÉREZ-ALVAREZ, J. A; SOARES, J; SOUSA, S; GOMES, A. M. P; PINTADO, M. M. E; In vitro evaluation of “horchata” co-products as carbon source for probiotic bacteria growth. **Food and Bioproducts Processing**, n. 91, p. 279 – 286, 2013.

SANTOS JÚNIOR et al. Viabilidade econômica de um produto a base de algas da associação de maricultoras do litoral Norte Potiguar. **Pubvet**, v.11, n.4, p.313-319, Abr., 2017.

SANTOS, N. P. S.; NASCIMENTO, S. C.; SILVA, J. F.; PEREIRA, E. C. G; SILVA, N.H. Usnic Acid - Loaded Nanocapsules : An Evaluation of Cytotoxicity. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 15: 355-361, 2005.

SILVA, I. M. C., SÁ, E. Q. C. Alimentos funcionais: um enfoque gerontológico. **Rev Bras Clin Med.** v. 10, n. 1, P. 24-32, jan-fev. 2012.

SILVA, Marlllyn Marques da et al. Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 103, p.282-291, abr. 2019.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: ITAL, 1995. 229 p. (Manual Técnico, 14).

SIMS, I.M., et al., In vitro fermentacion of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp. **Anaerobe**, v. 25, p. 11-17, 2014.

SOUSA, S; PINTO, J; PEREIRA, C; MALCATA, F.X; PACHECO, M.T.B; GOMES, A.M; PINTADO, M. *In vitro* evaluation of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) tuber flour prebiotic potential. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 96-105, 2015.

SUNDARAM, M., PATRA, S., & MANIARASU, G. Antitumor activity of ethanol extract of *Gracilaria edulis* (Gmelin) Silva on Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. **Journal of Chinese integrative Medicine**, v.10, n.4, p. 430-435, 2012.

TABARSA, M. et al. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (*Rhodophyta*) and *Ulva lactuca* (*Chlorophyta*) as a potential food source. **Journal Science Food Agriculture**, v. 92, n.12, p. 2500-2506, 2012.

TEIXEIRA, Lorisa Simas et al. Efficiency of Amazonian tubers flours in modulating gut microbiota of male rats. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s.l.], v. 38, p.1-6, dez. 2016.

TORRES, P. B. **Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies nativas de *Gracilaria* de importância econômica**. 2017. 288 f. Tese (doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

VASCONCELOS, B. M. F. **Utilização da macroalga *Gracilaria birdiae* no desenvolvimento de produtos alimentícios**. 2015. 124 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2015.

VASCONCELOS, B. M. F.; GONÇALVES, A. A. Macroalgas e seus usos: alternativas para as indústrias brasileiras. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 125-140, 2013.

WAGNER, Nathalia Ramori Farinha et al. Postoperative changes in intestinal microbiota and use of probiotics in roux-en-y gastric bypass and sleeve vertical gastrectomy: an integrative review. **Abcd. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 31, n. 4, p.1-5, 6 dez. 2018.