

**CAMILA GONÇALVES OLIVEIRA CHAGAS**

**EFEITO DO CONSUMO DE ALGA MARINHA (*Gracilaria birdiae*) EM  
FARINHA SOBRE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICAS DE  
RATOS ALIMENTADOS COM DIETAS NORMOLIPÍDICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C433e  
2015

Chagas, Camila Gonçalves Oliveira, 1987-  
Efeito do consumo de alga marinha (*Gracilaria birdiae*) em  
farinha sobre variáveis bioquímicas e morfométricas de ratos  
alimentados com dietas normolipídicas / Camila Gonçalves  
Oliveira Chagas. – Viçosa, MG, 2015.  
ix, 49f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ana Vlândia Bandeira Moreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Alga Marinha. 2. Algas como alimento. 3. Fibras -  
Consumo. 4. Ácidos Graxos. 5. *Gracilaria birdiae*.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Nutrição e  
Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição.  
II. Título.

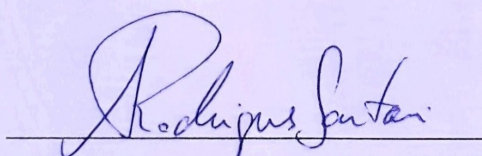
CDD 22. ed. 613.2

CAMILA GONÇALVES OLIVEIRA CHAGAS

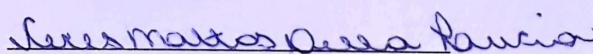
EFEITO DO CONSUMO DE ALGA MARINHA (*Gracilaria birdiae*) EM FARINHA  
SOBRE VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS E MORFOMÉTRICAS DE RATOS  
ALIMENTADOS COM DIETAS NORMOLIPÍDICAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

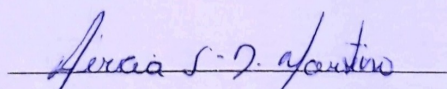
APROVADA: 30 de novembro de 2015



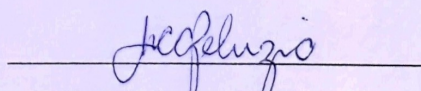
Sirlene Souza Rodrigues Sartori



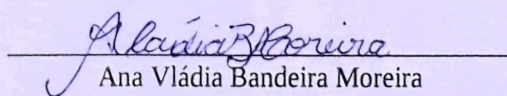
Ceres Mattos Della Lucia



Hércia Stampini Duarte Martino  
(Coorientadora)



Maria Do Carmo Gouveia Pelúzio  
(Coorientadora)



Ana Vlândia Bandeira Moreira  
(Orientadora)

*“Ando devagar  
Porque já tive pressa  
E levo esse sorriso  
Porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte  
Mais feliz, quem sabe?  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei  
Ou nada sei [...]  
É preciso amor pra poder pulsar  
É preciso paz pra poder sorrir  
É preciso a chuva para florir  
Penso que cumprir a vida  
Seja simplesmente  
Compreender a marcha  
E ir tocando em frente  
Todo mundo ama um dia  
Todo mundo chora  
Um dia a gente chega  
E no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua história  
Cada ser em si  
Carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz...”*

(Tocando em frente – Almir Sater)

***“Se você pode sonhar, você pode fazer.” (Walt Disney)***

Ao Projeto Algas, e, em especial, as maricultoras que me ensinaram como a pesquisa  
pode transformar vidas e ir além.

***“ sou ” (Rodrigo Linares)***

Aos meus pais Márcia e Geovani e ao meu irmão querido Victor por serem minhas  
raízes e me darem asas.

***“O amor só é lindo, quando encontramos alguém que nos transforme no  
melhor que podemos ser.” (Mário Quintana)***

Ao meu grande amor Rodrigo, por me inspirar a me transformar em minha melhor  
versão, diariamente.

Com muito amor,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Existe uma frase de um grande pensador e filósofo que faz muito sentido pra mim: “Gente não nasce pronta e vai se gastando, gente nasce não pronta e vai se fazendo”, costume completar essa frase com: “Ainda Bem!”.

Ainda bem, que a vida é um presente e cada dia um recomeço, com uma nova oportunidade. O mestrado me ensinou muitas coisas, mas ousou dizer que a maior delas foi revelar quantas pessoas graciosas eu tenho ao meu lado, que me amam e torcem por mim e hoje mais do que nunca, um sentimento se destaca em meio a esse turbilhão de sentimentos: o da GRATIDÃO!

Gratidão à Deus por não “soltar da minha mão” em nenhum momento, por me fazer reconhecer a dádiva que é a Vida e por ter me enchido de bênçãos ao longo dessa caminhada.

Gratidão à minha mãe Márcia e meu pai Geovani por ainda sonharem os meus sonhos, orando por mim e vibrando por minhas vitórias. Muito obrigada pelos olhares de amor.

Gratidão ao irmão e parceiro Victor (meu “querido!”) por todo o amor e companheirismo diários, que me davam força pra não desistir, e por confiar em mim e ter a certeza que eu conseguiria.

Gratidão ao Rodrigo, meu melhor amigo e amor da minha vida por me fazer descansar no seu amor e ser meu porto seguro nos momentos de tormenta. Aprendi com você o verdadeiro sentido de companheirismo e do amor. Obrigada pelo seu grande coração.

Gratidão a Ana Vlândia, meu melhor presente de Viçosa. Ana, obrigada por confiar em mim mais do que eu mesma! Obrigada pela paciência, carinho e generosidade desde o início da graduação. Você me inspira em cada gesto. Nosso convívio me permitiu aprender sobre entrega e doação e sou um ser humano melhor por isso. Obrigada!

Agradeço as co-orientadoras desse trabalho Hércia e Carminha por me acolherem sempre com um sorriso sincero! Agradeço pelas orientações e conselhos valiosos. Saibam que são profissionais que admiro muito pela competência e excelência no que realizam.

Agradeço a Sirlene por ter me acolhido quando cai de paraquedas! Obrigada pela ajuda, disponibilidade e orientação.

Agradeço a Ceres pelas agradáveis conversas e por ter aceitado o convite de contribuir com esse trabalho.

Agradeço aos amigos que fizeram essa caminhada mais leve, Projeto Algas, Pró-Celíacos e CHOICE, meu muito obrigada pela inspiração, por compartilhar sonhos e acreditar que nada é tão difícil que não possa ser feito.

Gratidão aos amigos que acompanharam esse trabalho mais de perto e torceram muito por mim, me encorajando e festejando as pequenas vitórias ao meu lado : Luma, Angela, Bia, Pri, Duanny, Gabi, Nath, Marcos, Carol, Dorina, Ká e tantos outros que de perto ou de longe ficavam na torcida!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Algas Marinhas – uma visão geral.....	3
2.2 Valor Nutricional das Algas e Componentes Bioativos .....	5
3 OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo Geral.....	6
3.2 Objetivos Específicos.....	7
4 METODOLOGIA.....	7
4.1 Preparo da Alga Gracilaria birdiae .....	7
4.1.1 Identificação da Alga Marinha.....	7
4.1.2 Cultivo e Coleta do Material .....	8
4.1.3 Preparo das Amostras.....	8
4.2 Animais e dietas experimentais .....	9
4.3 Coleta das Amostras .....	10
4.4 Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) .....	11
4.5 Morfofisiologia intestinal e hepática .....	12
4.5.1 Morfometria Hepática .....	12
4.5.2 Morfometria Intestinal.....	13
4.6 Parâmetros bioquímicos.....	13
4.7 Perfil Lipídico .....	14
4.7.2 Esterificação da fração lipídica .....	14
4.7.3 Condições da Cromatografia Gasosa para identificação do perfil de ácidos graxos .....	15
4.8.1 Umidade Fecal.....	15
4.8.2 Extração de ácidos graxos voláteis.....	15
4.8.3 Condições da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho para identificação dos ácidos graxos de cadeia curta :acético, propiônico e butírico .....	16
4.9 Análise Estatística.....	16
4.10 Aspectos Éticos.....	16
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	17



ARTIGO .....	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT .....	23
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3 RESULTADOS .....	30
4 DISCUSSÃO .....	39
5 CONCLUSÃO.....	45
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## RESUMO

CHAGAS, Camila Gonçalves Oliveira. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2015. **Efeito do consumo de alga marinha (*Gracilaria birdiae*) em farinha sobre variáveis bioquímicas e morfométricas de ratos alimentados com dietas normolipídicas.** Orientadora: Ana Vlândia Bandeira Moreira. Coorientadores: Hércia Stampini Duarte Martino e Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

A busca por alternativas fontes de fibras alimentares é crescente devido aos inúmeros benefícios relacionados à esse componente da dieta. Nesse sentido a *Gracilaria birdiae* torna-se um objeto importante de pesquisa por ser fonte de polissacarídeos pouco digeríveis pelas enzimas do trato gastrointestinal. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do consumo da *Gracilaria birdiae* em parâmetros de crescimento, bioquímicos e de saúde intestinal de ratos wistar recém desmamados. Os animais foram divididos em 3 grupos que receberam as seguintes dietas por 4 semanas: dieta controle; dieta com substituição parcial da fibra da dieta por *G. birdiae* (AP50) e dieta com substituição total da fibra da dieta por *G. birdiae* (AP100). Os animais dos grupos testes apresentaram maior consumo alimentar e mesmo ganho de peso em relação ao controle. O grupo AP100 apresentou maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados no tecido adiposo e menor presença de ácidos graxos com propriedades aterogênicas que o controle em todos os tecidos. Não houve diferença na concentração total de ácidos graxos voláteis, mas a presença da alga influenciou na composição destes, principalmente de acetato. A substituição parcial da fibra da dieta por algas foi suficiente para provocar aumento das camadas musculares no duodeno, cólon e ceco. Maior comprimento de mucosa e criptas foram observados no ceco e colon dos grupos AP50 e AP100. Não foram observados efeitos hepatotóxicos. Os grupos testes apresentaram maior volume cecal e fezes mais úmidas. Assim, o consumo da alga *G. birdiae* parece influenciar positivamente a composição de ácidos graxos dos tecidos e está relacionada ainda à modulação benéfica na morfologia intestinal.

## ABSTRACT

CHAGAS, Camila Gonçalves Oliveira. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, November; 2015. **Effect of seaweed consumption (*Gracilaria birdiae*) in flour in biochemical and morphometric variables of rats normal- fat diet.** Adviser: Ana Vlândia Bandeira Moreira. Co-advisers: Hércia Stampini Duarte Martino and Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

The search for alternative sources of dietary fiber is growing due to the numerous benefits associated to this component of the diet. In this sense the *Gracilaria birdiae* becomes an important object of research as source of polysaccharides little digestible by enzymes in the gastrointestinal tract. The aim of the study was to evaluate the effect of consumption of *Gracilaria birdiae* in growth parameters, biochemical and intestinal health weanling Wistar mouse. The animals were divided into 3 groups which received the following diets for 4 weeks: control diet; diet with partial replacement of dietary fiber by *G. birdiae* (AP50) and diet with total replacement of dietary fiber by *G. birdiae* (AP100). The animals of test groups showed higher food consumption and even weight gain compared to control. The AP100 group had a higher concentration of polyunsaturated fatty acids in the adipose tissue and presence lower of fatty acids with atherogenic properties than the control in all tissues. There was no difference in the total concentration of volatile fatty acids, but the presence of algae influenced the composition of these, especially acetate. The partial replacement of the fiber diet by algae was sufficient to cause increased muscle layers at the duodenum, colon and cecum. Larger length of mucosa and crypt were observed in the cecum and colon of AP50 and AP100 groups. There were no hepatotoxic effects. The test groups had higher cecal volume and wetter feces. Thus, consumption of seaweed *G. birdiae* seems to positively influence the fatty acid composition of tissues and is also related to the beneficial modulation of the intestinal morphology.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que a demanda humana por alimentos irá aumentar cerca de 70% até 2050. Ao avaliarmos a capacidade da agricultura em suportar essa demanda, notamos que a mesma é limitada devido a disponibilidade de terras e água, somado às alterações provocadas pelas mudanças climáticas (FORSTER, RADULOVICH, 2015). Nessa perspectiva os produtos da maricultura ganham destaque, em especial a algicultura (cultivo de algas), visto que a aplicação e utilização das algas como meio de auxiliar na oferta de produtos vegetais para a agricultura é notória e viável.

A presença de macroalgas marinhas na alimentação já está consolidada em países orientais como China e Japão, entretanto, essa prática na cultura ocidental é crescente e promissora (AMBROSOVA et al, 2014).

As algas são seres de organização estrutural bem simples que desempenham a manutenção do equilíbrio biológico no ambiente aquático permitindo o desenvolvimento de outros seres vivos e podendo ainda ser utilizada pelo homem como fonte alimentar e de matéria prima, principalmente em indústrias convencionais e de biotecnologia (SANTOS et al, 2011). A heterogeneidade dos organismos vegetais encontrados no grupo das algas é grande, sendo que as três principais divisões de macroalgas compreendem as algas vermelhas (divisão *Rhodophyta*), as algas pardas (divisão *Phaeophyta*) e as algas verdes (divisão *Chlorophyta*) (RORRER & CHENEY, 2004).

Como os demais seres marinhos, as algas apresentam uma composição química importante, visto que são fonte de vitaminas, minerais, proteínas, ácidos graxos essenciais e compostos bioativos como antioxidantes (GRESSLER et al 2010; CABRAL, 2012). Um dos componentes mais explorados nas algas marinhas são os hidrocolóides que se constituem por biopolímeros hidrofílicos de alto peso molecular. Das algas vermelhas, em especial às do gênero *Gracilaria*, são extraídos hidrocolóides como o ágar, componente que chega a representar mais de 70% da biomassa algal e têm importante valor comercial, principalmente pela utilização como espessante/geleificante na indústria de alimentos (MOTA, 2011).

O ágar é um polissacarídeo composto basicamente por frações de agarose e agarpectina, facilmente solúvel em água quente, formando géis termo reversíveis (SOUZA, 2008). No organismo humano, esse polissacarídeo sulfatado se comporta como

fibra alimentar solúvel (PEREIRA, 2012) que caracteriza efeitos hipoglicemiantes e hipocolesterolêmico. À esses polissacarídeos sulfatados são encontrados ainda alegações anti-inflamatórias, antioxidantes e antimutagênicas (ANDRADE et al, 2013; GUARATINI, 2008).

A macroalga marinha da espécie *Gracilaria birdiae* é uma alga vermelha abundante no litoral brasileiro (BEZERRA, 2008). As investigações realizadas com essa alga se limitam a otimizar o cultivo e a qualidade do ágar, sendo pouco explorado suas propriedades bioativas e a utilização dessa espécie como matéria prima e ingrediente alimentar.

A partir disso, ressalta-se a importância de estudos que investiguem as propriedades dessa alga in natura e não somente de seus componentes isolados, como premissa para elaboração de produtos com alegação funcional à base desses organismos. Em 2003, juntamente com o Ministério da Aquicultura e Pesca (MPA), a Organization Food Agriculture (FAO) fomentou um projeto em comunidades litorâneas de 3 estados do Brasil, sendo estes Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba. O projeto estimulou o desenvolvimento de comunidades costeiras com apoio ao cultivo sustentável da macroalga *G. birdiae* bem como outros organismos do mar (BEZERRA, 2008). Com duração de 5 anos, o projeto revelou que as técnicas de cultivo sustentável, principalmente voltadas ao cultivo de algas – algicultura – tiveram uma boa aceitação e foram facilmente reproduzidas pelos maricultores das comunidades, se tornando assim uma fonte alternativa de renda, uma vez que agregou valor à matéria prima, aumentando em 5 vezes o preço pago pelas indústrias quando comparado com o das algas coletadas em bancos naturais (FAO, 2010).

Com o cultivo da espécie de interesse consolidado, o presente trabalho busca subsidiar resultados que suportam e asseguram o desenvolvimento de produtos alimentícios à base de algas; afim de garantir suas propriedades fitoquímicas como os antioxidantes e acréscimo de fibras alimentares nos produtos; bem como, investigar o efeito funcional das algas para fins de segurança do alimento a ser desenvolvido, para que estas premissas possam permitir uma visão holística da comunidade litorânea assistida, entendendo que toda a proposta de transformação e desenvolvimento da comunidade deve levar em conta sua história, seus costumes e sua realidade em torno de um alimento sustentável, seguro e nutritivo.

Assim, tecnologias sociais aliadas a pesquisas que visem o beneficiamento das algas em diferentes cadeias de produção, principalmente a alimentícia, estimulam não só a inovação técnico- científica, como também geram impacto econômico e social por desenvolver as comunidades costeiras e propiciar a oferta e valorização de um produto abundante no país.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### ***2.1 Algas Marinhas – uma visão geral***

O termo genérico algas inclui organismos polifiléticos fotossintetizantes que desempenham importante papel ecológico por serem responsáveis por mais de 50% do total da produção primária de todo o planeta (PAULA et al, 2007). As algas podem ser classificadas em microalgas e macroalgas. As microalgas integram o fitoplâncton e são responsáveis por uma parte significativa da captação do gás carbônico e do oxigênio produzido no mundo. Já as macroalgas, grupo de maior interesse nesse estudo, são reconhecidamente importantes como fonte de produtos químicos, principalmente ficocolóides (SILVA, 2005).

As divisões de macroalgas são baseadas principalmente em propriedades como a pigmentação, produtos de reserva, organização das membranas fotossintéticas, dentre outras características morfológicas (KILINÇ et al, 2013). As algas bentônicas são multicelulares e crescem em substratos fixos, residindo em regiões do supra, médio e infra – litoral (TEIXEIRA, 2013; PAULA et al, 2007).

Tem como principais divisões as *Chlorophyta* ou algas verdes com cerca de 1200 espécies e que possuem as clorofilas *a* e *b* como pigmentos principais. A divisão *Phaeophyceae* é representada por cerca de 1750 espécies, sendo conhecidas por algas pardas ou marrons e que, apesar de possuírem clorofila *a* e *c*, os carotenoides são seus principais pigmentos. Já a divisão *Rhodophyta*, algas vermelhas, representam um dos mais diversificados grupo de algas, com cerca de 6000 espécies, e conhecidas por sua pigmentação avermelhada, conferida pelas ficobilinas, havendo ainda carotenoides ( $\beta$ -caroteno; zeaxantina e luteína) e clorofila *a* (KILINÇ, 2013; TEIXEIRA, 2013; PAULA, 2007).

A importância econômica das algas marinhas, bem como o aumento dos estudos acerca da otimização do seu cultivo e extração de componentes biológicos se intensificou após a 2ª Guerra Mundial (1945) quando o Japão restringiu a exportação de ficocolóides (polissacarídeos coloidais extraído de algas) para países ocidentais. Como esses produtos eram importantes para a produção em diversas indústrias, restou aos países do ocidente explorar outras espécies de algas para a extração de produtos com características semelhantes ao japonês, assim, deu-se a descoberta, isolamento e purificação de diversas substâncias conhecidas hoje como ágar, carragenana e alginatos (BEZERRA, 2008).

Um recente levantamento da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) afirmou que as áreas cultiváveis de algas marinhas dobrou entre os anos de 2000 e 2012, sendo os países asiáticos China e a Indonésia os que lideram a produção, dominando 81.4% do total (FAO, 2014). Esse crescente aumento decorre da importância das algas na agricultura bem como nas indústrias de biotecnologia.

Dapper e colaboradores (2014) ao investigar as potencialidades bem como a utilização das algas marinhas na agricultura verificou que essas são empregadas sob três condições principais: controle direto de fitopatógenos, promoção de crescimento e desenvolvimento vegetal, e indução de mecanismos de defesa da planta através de suas biomoléculas. Acerca dos grupos de algas mais utilizados para esses fins foi determinado que as algas marrons são as mais requeridas, seguida das algas verdes e vermelhas (DAPPER et al, 2014). É válido ressaltar ainda que além da utilização como fertilizante e bioestimulantes naturais, as macroalgas marinhas tem sido empregadas também na produção de biofilmes (CIAN et al, 2014) e para a extração de polissacarídeos sulfatados com fins terapêuticos (SUBBA, LAKSHMI, MAJUBA, 2010; BU, KKWON, SUNG, 2014; CHAN et al, 2014) e tecnológicos (SOUZA, 2012).

O Brasil tem uma extensa costa entre as zonas das marés, sendo cerca de 8.500km dominada pelas algas (GIULIETTI *et al*, 2005). Segundo Oliveira Filho (1977) o Brasil apresenta 539 espécies de macroalgas, incluindo 116 espécies (35 gêneros) de algas verdes, 359 espécies (135 gêneros) de algas vermelhas e 64 espécies (29 gêneros) de algas pardas. Esses dados evidenciam o potencial do Brasil tanto em explorar estudos com algas quanto investigar o impacto da mesma se inserida na alimentação. O interesse da flora algal no Brasil aumentou tanto que nos anos de 2012 – 2013 as pesquisas brasileiras investigando os efeitos das algas marinhas cresceram cerca de 78% em relação ao período de 2006 e 2010 (FERNANDES et al, 2014).

## **2.2 Valor Nutricional das Algas e Componentes Bioativos**

O valor nutricional das macroalgas bem como seu benefício à saúde tem sido investigados na literatura (BROWN, E. M. et al, 2014; BOCANEIRA et al, 2009).

Em geral as algas marinhas são consideradas alimentos de baixas calorias, com elevada concentração de sais minerais, vitaminas e de proteínas, ricos em fibras e relativamente elevadas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (CARNEIRO, MARINHO-SORIANO, PLASTINO, 2011; RISSO et al. 2003). Constituem uma importante fonte de compostos ativos com numerosas aplicações farmacológicas, sendo que os principais estudos permeiam sua ação anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante e antimicrobiana (FIDELIS, 2014).

Um dos componentes bioativos extensamente explorados em algas marinhas são aqueles que desempenham efeitos antioxidantes no organismo. Como mecanismo de defesa à ação deletéria desses agentes, as algas marinhas desenvolvem metabólitos secundários com ação antioxidante, ou seja, substâncias que em baixa concentração conseguem minimizar ou inibir as taxas de oxidação (HALLIWEL, 2000). Entre os principais compostos antioxidantes presentes em algas, destacam-se os carotenóides, ácido ascórbico e os compostos fenólicos. Essa propriedade é extensamente explorada pela indústria de alimentos, uma vez que se procura a substituição de aditivos sintéticos por naturais e também a elaboração de produtos com essa ação funcional.

Outro componente interessante na composição nutricional das algas marinhas são os hidrocolóides algais, substâncias presentes em maior proporção e que não são digeridos pelas enzimas digestivas, comportando-se portanto como fibras alimentares. Tal fato implica em efeitos hipoglicemiantes e hipocolesterolêmicos no organismo humano (BURTON, 2003). Diversos estudos demonstram que as galactanas sulfatadas isoladas das algas marinhas vermelhas, apresentaram potentes atividades anticoagulantes (FARIAS et al. 2000; RODRIGUES et al. 2010), sendo a espécie *G. birdiae*, a rodófito a apresentar maior quantidade de polissacarídeos sulfatados totais, segundo estudo realizado por Rodrigues et al. (2010) sendo indicada, portanto, como boa fonte deste nutriente.

Acerca do conteúdo protéico presentes nas algas vermelhas, ressalta-se que estas são constituídas de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina), pigmentos relacionados com a fotossíntese (PAULA et al. 2007) e que recentemente tem chamado a



atenção em diversos estudos, devido a sua ação antioxidante, propriedade benéfica para a prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis.

Entre os minerais presentes, em virtude do próprio habitat em que estas algas estão inseridas, estudos mostram que estas são fontes principalmente de cálcio, potássio, magnésio, sódio (MACARTAIN, 2007) e iodo (BURTIN, 2003), chegando esta porção mineral a representar até 35% da matéria seca (BURTIN, 2003).

As algas de um modo geral apresentam um baixo teor de lipídeos, porém esses apresentam uma composição de ácidos graxos relevantes, já que são em sua maioria representados por ácidos graxos insaturados. Guaratini (2008) descreveu o perfil lipídico da espécie *G. birdiae* no qual foi encontrado em grande concentração (52%) o ácido araquidônico (C20:4). Este ácido graxo essencial da série  $\omega 6$  é reconhecido por originar substâncias que estimulam as reações inflamatórias, as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (GUARATINI, 2008; CARVALHO et al. 2009). As algas marinhas vermelhas, destacam-se também por ácidos graxos da série  $\omega 3$  que desempenham efeito antiinflamatório no organismo, agindo dessa forma na prevenção de doenças cardiovasculares e demais patologias (SANTOS et al. 2008).

Dessa maneira, as algas marinhas revelam uma composição química condizente com uma dieta saudável, que possui elementos importantes para uma boa nutrição devido ao seu conteúdo de fibra e componentes bioativos, que além de exercer toda a sua ação funcional no organismo, permite também substituir ingredientes sintéticos por naturais devido à suas propriedades físicas, implicando em produtos alimentícios com menor conteúdo de aditivos industriais que representam riscos à saúde.

### **3 OBJETIVOS**

#### ***3.1 Objetivo Geral***

Avaliar o efeito do consumo de farinha de alga marinha *Gracilaria birdiae* sobre o ganho de peso, metabolismo de lipídeos, morfometria intestinal e hepática em ratos *wistar* recém desmamados.

### 3.2 *Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito da alga *G. birdiae* na forma de farinha no consumo alimentar e ganho de peso de ratos alimentados com dietas normolipídicas;
- Avaliar a influência da fibra da alga *G. birdiae* no metabolismo de ácidos graxos no tecido adiposo, hepático e do plasma.
- Investigar o efeito da adição da alga *G. birdiae* em dietas experimentais na morfometria intestinal (duodeno, ceco e cólon) e hepática;

## 4. METODOLOGIA

O presente estudo se constitui como parte de um projeto maior intitulado: *ESTABILIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS À BASE DE ALGAS MARINHAS: Relação entre os conteúdos lipídico e antioxidante no impacto de produtos com tecnologia social*. Em sua maior extensão, o projeto algas tem como premissa a elaboração de produtos à base de algas marinhas para que estes sejam utilizados como ferramentas de tecnologia social e agentes promotores da saúde na área de alimentação e nutrição.

Diante de tal realidade, a proposta deste subprojeto é de fundamental importância para agir como premissa na alegação dos benefícios funcionais das algas marinhas da espécie *Gracilaria birdiae*.

### 4.1 *Preparo da Alga Gracilaria birdiae*

#### 4.1.1 *Identificação da Alga Marinha*

A espécie estudada pertencente à divisão *Rhodophyceae* inclusa na Classe *Florideophyceae* da ordem *Gracilariales* pertencendo à família *Gracilariaceae* do gênero

*Gracilaria greville*. A espécie *Gracilaria birdiae* é frequentemente encontrada sobre substratos duros no litoral do Nordeste do Brasil, principalmente na zona do médiolitoral e infralitoral. Sua estrutura vegetativa é caracterizada por um talo ereto de forma cilíndrica com 2,3 mm de diâmetro, podendo alcançar até 46 cm de altura (PLASTINO & OLIVEIRA, 2002).

#### *4.1.2 Cultivo e Coleta do Material*

As algas utilizadas nesse estudo foram cultivadas na praia de Rio do Fogo, litoral do Rio Grande do Norte, entre as coordenadas 05°15' 49" S e 35°23' 03" W. A coleta do material foi realizada sob maré baixa e em pontos diversificados das comunidades algais, para garantir variabilidade amostral. Após essa seleção, as amostras foram processadas, embaladas e armazenadas para análises no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

#### *4.1.3 Preparo das Amostras*

Para a obtenção das algas em pó, foi realizado o processamento das mesmas na unidade de beneficiamento local, seguindo o protocolo já existente. Inicialmente, foi realizado a desidratação da matéria prima. As algas foram expostas ao sol no período da manhã com a finalidade de perder toda a umidade e no final da tarde foram transferidas para as caixas d'água e ficaram imersas durante à noite. No dia seguinte, o mesmo procedimento de secagem e imersão em água foi realizado. Este processo se repetiu por 3 dias, até que as algas assumissem uma coloração esbranquiçada. A alga marinha bruta seca foi triturada em moinho da marca Trigre® do tipo cilindro para moagem de granulados. O início do processo incidiu em duas moagens consecutivas, sendo a primeira importante para transformar a alga bruta seca em peletes menores e a segunda essencial para que a amostra adquirisse a característica de pó, com 120 mesh (BEZERRA, 2008).

#### ***Estudo do efeito funcional das algas *Gracilaria birdiae* in vivo***

#### 4.2 Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, classe odentia), linhagem Wistar, recém-desmamados, com média de 21 a 23 dias de idade, com peso corporal variando entre 50 a 60 g, provenientes do biotério da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, em ambiente de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luz controladas, em ciclo claro-escuro de 12 h.

Os animais foram divididos em quatro grupos com seis animais cada, de forma sistemática, de maneira que a diferença entre os grupos fosse a mínima possível. A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, proposto por Reeves, Nielsen e Fahey (1993).

Para o preparo das dietas testes foram acrescentadas algas *G. birdiae* em pó na quantidade suficiente para fornecer 50% e 100% do teor de fibras alimentares da dieta. Na dieta proposta por Reeves et al (1993) a fonte de fibra alimentar para roedores é a celulose (5g/100g de dieta), assim, esta foi substituída de forma parcial (50% da recomendação) e integral (100% da recomendação) por algas marinhas nos grupos teste, afim de avaliar o efeito da mesma no organismo dos animais. Como o objetivo do estudo também foi de avaliar o efeito do consumo de alga na qualidade protéica da dieta o conteúdo de proteína da dieta foi alterado para entre 9% e 10%.

Dessa maneira o estudo foi composto pelos seguintes grupos: controle (celulose); alga em pó 50% de substituição (AP50) e alga em pó 100% de substituição (AP100) (TABELA 1). Durante 28 dias os animais tiveram acesso as dietas experimentais e água deionizada *ad libitum*.

**Tabela 1:** Formulação das dietas experimentais (g/100g de dieta)

<b>Ingredientes</b>	<b>Dietas</b>		
	<i>Controle</i>	<i>AP50</i>	<i>AP100</i>
Alga <i>Gracilaria birdiae</i> em pó <sup>1</sup>	0	6,5	13,1
Caseína	13,2	12,8	12,3
Maltodextrina	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10	10	10
Celulose	5	2,5	0
Óleo de Soja	7	6,9	6,8
Mix Mineral AIN93G	3,5	3,5	3,5
Mix Vitaminas AIN93G	1	1	1
L- Cistina	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25
Amido de Milho	46,55	43,05	39,55

Adaptação à dieta padrão AIN-93G. AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga. <sup>1</sup> composição química *G. birdiae*: 70,97% carboidratos, 38,26% fibras ( 22,14% solúvel e 16,12% insolúvel); 4,69% proteínas; 1,2% lipídeos; 8,62% minerais

#### **4.3 Coleta das Amostras**

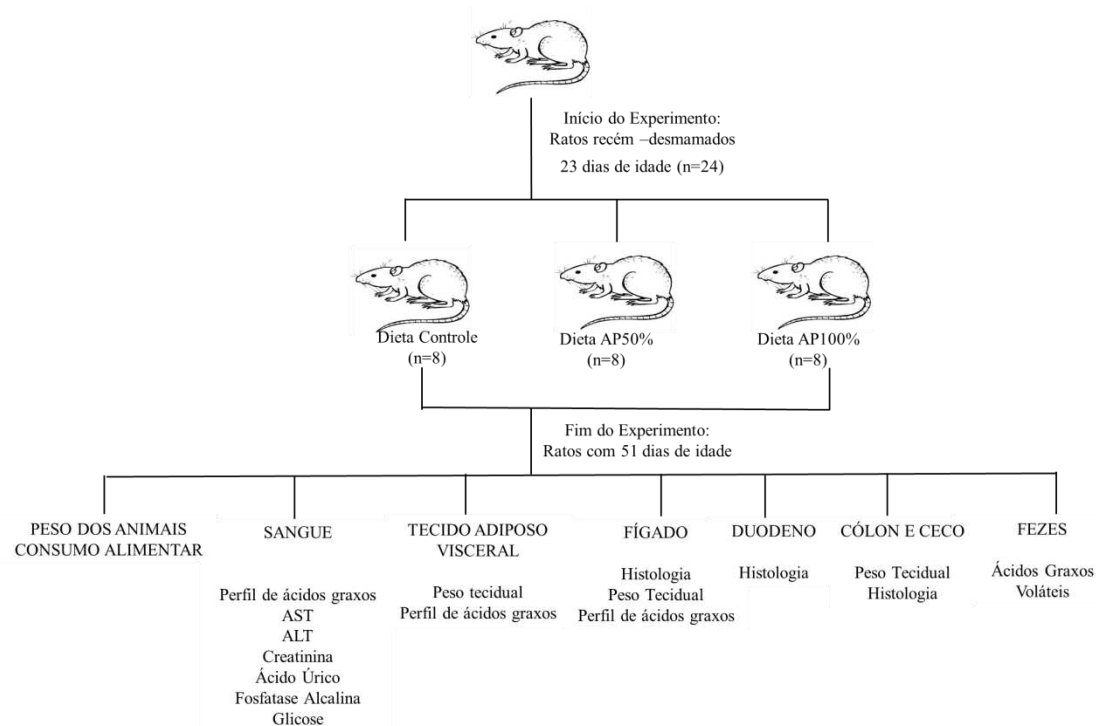
No 27º dia os animais foram submetidos a um jejum de 10 horas durante o período noturno. No 28º dia, foi realizado a última pesagem dos animais e os mesmos foram anestesiados com isoflurano. A eutanásia aconteceu por punção cardíaca para a coleta das amostras sanguíneas.

O conteúdo sanguíneo coletado em tubo com gel e tubo heparinizado foi centrifugado por 30 minutos a 3500 rpm para coleta do soro e plasma. O fígado e tecido adiposo visceral foram retirados, pesados e imediatamente congeladas sob nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a temperatura de -80°C até o momento das análises.

Para as análises histológicas foram coletados pequenos fragmentos do fígado, intestino delgado (porção proximal do duodeno) e intestino grosso (porção distal do colón e ceco). Os fragmentos foram coletados, lavados com tampão fosfato salino (PBS),

acondicionados em solução formalina 10% por um período de 48 horas, e preservados em álcool 70% até o momento da análise.

O desenho experimental encontra -se ilustrado na figura 1.



**Figura 1:** Desenho experimental

No período experimental os animais foram pesados no 7°, 14°, 21° e 28° dias, havendo o controle semanal da ingestão alimentar. O consumo alimentar das dietas foram mensurados semanalmente.

#### 4.4 Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA)

Esse índice avalia a eficiência da dieta em promover o ganho de peso corporal, do animal alimentado com uma dieta específica, durante um período de teste. O CEA foi calculado através da razão do ganho de peso em gramas e o consumo da dieta.

#### ***4.5 Morfofisiologia intestinal e hepática***

Os fragmentos de fígado, duodeno, colón e ceco que permaneceram em álcool 70% foram submetidos a etapa de desidratação, sendo imersos posteriormente em álcool 80%, 90%, 95% e por último, em álcool absoluto, permanecendo 30 minutos em cada solução alcoólica.

Para as etapas de pré infiltração, infiltração e inclusão em resina, foi utilizado o Kit de resina plástica Leica Historesin®.

Após a etapa de desidratação deu-se início a etapa de pré-infiltração, no qual os tecidos foram imersos *overnight* em solução de álcool absoluto e resina glicolmetacrilato. A infiltração aconteceu por imersão dos tecidos em solução de resina pura por 2 horas para inclusão. A inclusão dos órgãos foi realizada em resina na presença do endurecedor composto por derivado do ácido tiobarbitúrico. Os fragmentos incluídos em resina foram acondicionados em formas específicas para emblocamento e acondicionados em estufa a 45°C até que adquirissem uma dureza que permitia o corte dos tecidos para montagem das lâminas.

Os fragmentos foram seccionados em 3 µm de espessura em micrótomo automático com navalha de vidro. A seleção dos cortes para compor as lâminas foi realizado de forma salteada, garantindo uma análise da extensão do tecido. Assim, a cada corte selecionado, os dez cortes posteriores eram descartados. Cada lâmina foi composta de 12 cortes do mesmo tecido. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina para morfometria. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck®).

As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio digital da marca Leica®. Foram escolhidos dez campos aleatórios para cada animal, dentro do material disponível para estudo.

##### ***4.5.1 Morfometria Hepática***

Secções histológicas do fígado de cada animal foram selecionadas aleatoriamente para análise. As imagens foram obtidas em fotomicroscópio com câmara digital acoplada, utilizando-se objetiva de 40x e resolução de 1600x1200 pixels. Foram analisadas 80 imagens de cada grupo, sendo contabilizado pontos sobre núcleo, citoplasma, capilares sinusóides e gotículas de gordura.

A contagem dos parâmetros nos campos selecionados foi realizada com o auxílio do Software Image Pro-Plus® versão 4.5. Padronizamos a sobreposição de uma matriz retangular (19 linhas e 14 colunas) nos campos fotografados de forma que totalizasse uma contagem final de 266 pontos. Foram contabilizados apenas as estruturas presentes nos pontos coincidentes às interseções. Os resultados foram expressos em percentual (%).

#### *4.5.2 Morfometria Intestinal*

Os fragmentos do duodeno proximal foram analisados através da objetiva de aumento de 4X e resolução de 1600x1200 pixels. Foi mensurado as medidas referentes ao tamanho das camadas musculares, submucosa e mucosa; comprimento das vilosidades intestinais, bem como diâmetro da base e do ápice da vilosidade, e o comprimento e diâmetro das criptas.

Já para a morfometria do colón e ceco foi utilizado a objetiva de 10X no qual também foi mensurado as camadas musculares, submucosa e mucosa, bem como o comprimento e diâmetro das criptas.

Foram retiradas no mínimo 80 medidas de cada parâmetro por grupo experimental. Estas medidas foram feitas utilizando-se régua micrométrica acoplada à ocular de microscópio de luz. Para análise foi utilizado o programa Image Pró Plus®, versão 4.5 calibrado.

#### **4.6 Parâmetros bioquímicos**

Todos os parâmetros bioquímicos foram aferidos por kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante.

*Alanina Amino Transferase (ALT):* A concentração de alanina amino transferase (ALT) foi determinada no plasma dos animais pelo teste colorimétrico, utilizando-se kit transferase ALT cinética.

*Aspartato Amino Transferase (AST):* A concentração de aspartato amino transferase (AST) foi determinada no plasma dos animais pelo teste colorimétrico, utilizando-se kit transferase AST cinética.



*Ácido Úrico:* O teor de ácido úrico no soro foi realizado utilizando o teste enzimático colorimétrico de ácido úrico.

*Creatinina:* A creatinina foi dosada no soro utilizando o método cinético.

*Glicose:* A concentração de glicose foi dosada no soro animais através do método glicose monorreagente.

## **4.7 Perfil Lipídico**

### *4.7.1 Extração da fração lipídica*

Para a extração dos lipídeos totais do plasma, fígado e tecido adiposo foi utilizado o método de FOLCH et al (1957). Foram homogeneizado na proporção de 1:10 (p/v) 400 mg de tecido com solução de metanol e clorofórmio (1:2 v/v). Agitou-se em vortex por 3 minutos, e acrescentou-se 2,4 mL de metanol puro. O material foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm para separação das fases. Em seguida o sobrenadante foi transferido para um tubo previamente pesado e identificado. À esse sobrenadante foi adicionado NaCl 0,73% e o mesmo foi homogeneizado por 1 minuto. A separação das fases foi aguardada. Com o auxílio de uma pipeta de pasteur, por aspiração, a fase superior foi desprezada e à fase inferior foi adicionada o reagente de FOLCH. A lavagem foi realizada 3 vezes. A fração lipídica foi obtida após toda evaporação do solvente em estufa a 40°C, sendo tal valor determinado por gravimetria e utilizado para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, para posterior análise cromatográfica.

### *4.7.2 Esterificação da fração lipídica*

As amostras anteriormente extraídas, foram esterificadas pelo método proposto por HARTMAN e LAGO (1973). Às frações lipídicas, foram adicionados solução metanólica de NaOH 0,5 N e levado ao banho-maria a 80°C por 15 minutos. A partir dessa etapa, foram adicionados o reagente de esterificação, solução metanólica composta por cloreto de amônio e ácido sulfúrico concentrado, sendo a mistura novamente colocada em banho-maria por mais 15 min. Após esfriar, foram adicionado às amostras NaCl 20% e 0,5mL de hexano, sendo homogeneizado em vórtex por 30 segundos. Após essa etapa,

adicionou-se mais 0,5mL de hexano sendo o sobrenadante recolhido e transferido para um ependorff onde foi concentrado em nitrogênio líquido e mantido sobre congelamento até o momento da cromatografia gasosa.

#### *4.7.3 Condições da Cromatografia Gasosa para identificação do perfil de ácidos graxos*

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo CG – 17 A Detector de Chama (FID), marca SHIMADZU. Para registro e análise dos cromatogramas, o aparelho é acoplado a um microcomputador, utilizando-se o programa GC Solution. Os compostos foram separados e identificados em uma coluna capilar Carbowax marca SUPELCO®, (30 m x 0,25 mm). Para a separação cromatográfica, 1 µL de amostra foi injetado com auxílio de seringa de 10 µL (Hamilton®) em sistema Split = 10. O gás Nitrogênio foi utilizado como carreador. As temperaturas do injetor e do detector foram controladas isotérmicas em 220°C e 240°C. A temperatura inicial da coluna foi de 140°C (mantida por 5 minutos), aumentando em 4°C por minuto até atingir 240°C com parada de 20 minutos. O Fluxo do gás de arraste na coluna foi de 1,0 mL/minuto.

A identificação dos compostos foi realizada através do tempo de retenção do padrão correspondente.

### **4.8 Umidade Fecal e Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCC)**

#### *4.8.1 Umidade Fecal*

A umidade fecal foi determinada por gravimetria das amostras de fezes antes e após secagem em estufa a 105° C por 24 horas (AOAC, 2005). O resultado foi expresso em percentual de umidade.

#### *4.8.2 Extração de ácidos graxos voláteis*

A extração dos ácidos graxos de cadeia curta aconteceu de acordo com o método proposto por Smircki – Tjardes, 2003) utilizando o ácido metafosfórico a 25% como

solvente de extração. Foram pesados 500mg de resíduos cecais e acrescentados 900 $\mu$ L de ácido metafosfórico 25%. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 2 minutos e centrifugadas a 13500rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4° C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e transferido para um eppendorf. O conteúdo foi filtrado em filtro com porosidade de 45 $\mu$ m e diluído em água ultrapura na proporção de 1:1. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento das análises.

#### *4.8.3 Condições da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho para identificação dos ácidos graxos de cadeia curta :acético, propiônico e butírico*

A análise foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), marca SHIMADZU®, Detector modelo SPD-20A VP acoplado ao Detector Ultra Violêta (UV) com comprimento de onda de 210nm. Para a análise, foram injetadas 20 $\mu$ L da amostra. Os compostos foram separados e identificados pela coluna EC nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel® (250cm x 4.6mm), utilizando como fase móvel água ultrapura e Ácido Orto Fosfórico, grau HPLC na proporção de 99:1. A temperatura do forno foi de 30 °C com vazão de fluxo: 0,6 mL. min<sup>-1</sup>. Aquisição de dados realizada pelo software Lab Solutions, Shimadzu Corporation (2013).

#### **4.9 Análise Estatística**

Os dados foram submetidos primeiramente à análise de normalidade e posteriormente à análise de variância - ANOVA ( $\alpha = 5\%$ ) com 3 grupos e 8 repetições. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Turkey assumindo um erro de 5%. Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando-se o software SPSS, versão 20.0, licenciado para a UFV. Os resultados são expressos em média e desvio padrão.

#### **4.10 Aspectos Éticos**

O estudo foi conduzido segundo as Normas Brasileiras de Experimentação Animal e submetido ao Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (n° do processo 24/2013). O presente ensaio foi executado durante as aulas práticas da Disciplina Nutrição Experimental (NUT 327 – DNS/UFV).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSOVA, J.V. et al. Influence of Extractive Solvents on Lipid and Fatty Acids Content of Edible Freshwater Algal and Seaweed Products, the Green Microalga *Chlorella kessleri* and the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Molecules**. V19, p. 2344-2360; 2014

ALISTE, A. J. **Radiação dos Hidrocolóides Carragenanas, Agaranas e Alginatos Utilizados na Indústria Alimentícia**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. Gaithersburg (MD): AOAC, 2005.

BALDASSO, C. MARTINS S. SANGIOVANNI, P. **Espessantes**. Relatório final da disciplina Marketing e Desenvolvimento de novos Produtos - UFRGS. Rio Grande do Sul, 2004.

BENDER, A. E. e DOEL, B. H. Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. **British Journal of Nutrition**, v. 11, n. 2, p.138-139. 1957

BEZERRA, A.F. **Cultivo de algas marinhas como desenvolvimento de comunidades costeiras**. 69f. Dissertação (Mestrado) - Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente/Prodema, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008

BOCANEGRA, A. et al. Characteristics and Nutritional na Cardiovascular – Health Properties of Seaweeds. **Journal of Medicinal Food**. v. 12; n.2; p. 236-258, 2009

BROWN, E. M. Seaweed and human health. **Nutrition Reviews**. vl. 72; n.3; p. 205–216; 2014

BU, S.Y.; KWON,H; SUNG. M. Supplementation of Seaweeds Extracts Suppresses Azoxymethane-induced Aberrant DNA Methylation in Colon and Liver of ICR Mice. **Journal of cancer prevention**, v.19; n.3; 2014.

BURTIN, P. Nutritional Value Of Seaweeds. **Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.**, v. 2, n. 4 p.498- 503, 2003.

CABRAL, I.S.R; Shirahigue, L.D; Arruda, L.F; Carpes, S.T; Oetterer,M. produtos naturais de algas marinhas e o seu potencial antioxidante e antimicrobiano. B.CEPPA; 2:181-192, 2012

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.**, Curitiba, v. 21, n. 2, 2011.

CARTÉ, B.K. Biomedical potential of marine natural products. **Biociencia**, v.46, p.271-286, 1996.

CARVALHO, L. R., et al. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macrolagas marinhas. **Química Nova**, v. 23, n 6, 2009.

CIAN, R. E. et al. Development of naturally activated edible films with antioxidant properties prepared from red seaweed *Porphyra columbina* biopolymers. **Food Chemistry**. v. 146; p. 6–14; 2014

CHAN, P.T. et al. Antioxidant and hypolipidaemic properties of red seaweed, *Gracilaria changii*. **J Appl Phycol**. v. 26; p 987-997; 2014.

CUNHA, M. A. A. C; GÓMEZ, R. J. H.C.; AMORIM, E. S. Goma curdlana: um importante hidrocolóide microbiano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 379-384, 2003.

DAPPER, T. B. et al. Potencialidades das Algas Marinhas na Agricultura: Revisão. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.7, n.2, p. 295-313. 2014

DORTA, E., DARIAS J., SAN, A.M.; CUETO, M. New prenylated bromoquinols from the green alga *Cymopolia barbata*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, p.329-333, 2002.

ESTELLER, M. S.; JÚNIOR, O. Z.; LANNES, S. C. S.; Bolo de “chocolate” produzido com pó de cupuaçu e kefir. **Rev. Bras. Ciên. Farmac.** vol. 42, n. 3, p. 447-454, 2006.

EVANCHO, G.M.; SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; FRANK, J.F. Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 rd. [S.l.]: APHA, cap. 3, p. 25-36, 2001.

FAO – Food and Agriculture Organization. Yearbook. Fishery and Agriculture Statistic. **World Aquaculture Production of Aquatic Plants**, 2010.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Rome. 223 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FARIAS, W.R.L., VALENTE, A.P., PEREIRA, M.S. & MOURÃO. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n.38, p. 29299-29307, 2000.

FARNWORTH, E. D. Kefir - A complex probiotic. **Food Sci. Technol.** v.2, p.1-17, 2005.

FERNANDES, D.R.P.; DE OLIVEIRA, V.P.; VALENTIN, Y.Y. Seaweed biotechnology in Brazil: six decades of studies on natural products and their antibiotic and other biological activities. **Journal of Applied Phycology**, p.1-15; 2014

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

GIULIETTI, A.M. *at al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.52-61, 2005

GUARATINI, T. **Atividade Antioxidante de Macroalgas Marinhas: Caracterização Química e Atividade *in vitro***. 152f. Tese (Doutorado)- Instituto de Química da universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KAIN, J.M. & DESTOMBE, C. A review of the life history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v.7, p. 269-281, 1995.

KILINÇ, B. *et al.* Seaweeds for Food and Industrial Applications. **Food Industry**, p. 978-953. 2013

KORNACKI, J. L. & JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods, A. 4 ed. APHA, Washington, D.C, cap. 8, p. 69-80, 2001.

MOTA, N.S. **Valor nutricional das magroalgas marinhas *Ulva Fasciata*, *Gracilaria Cornea* e *Sargassum Vulgare*, coletadas no litoral da Bahia**, Brasil. 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011;

MAcARTAIN,P. *et al.* Nutritional Value of Edible Seaweeds. **Nutrition Reviews**, v.65, n. 12, p.535-543, 2007.

McCANDLES, E.L.; GRIGIE J.S. **Sulfated polyssacharides in red and brohw algae**. In: SILVA, F.R.F. **Estudo Comparativo de carreganas comerciais Kappa, Iota e Lambda no processo inflamatório em ratos: edema, intraplantar e pleurisia**. Dissertação (Mestrado), Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

OLIVEIRA FILHO, E.C. **Algas marinhas bentônicas do Brasil**. Tese Livre Docência, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977

OLIVEIRA, E.C.; PLASTINO, E.M. Gracilariaceae. *In* Biology of economic seaweeds. **SPB Academic Publishing, The Hague**, p.185-226, 1994.

PAULA, E. J. et al. Introdução ao Estudo das Algas. *In*: **Introdução a Biologia das Criptógamas**. Sao Paulo: Instituto de Biociencias da Universidade de Sao Paulo, Departamento de Botanica, 184 p., 2007.

PEDROSO, R. A. **Avaliação da influencia do amido e carragena nas características físico-químicas e sensoriais de presunto cozido de peru**. Dissertação (mestrado) - Área de ciências e tecnologia de alimentos. Ponta Grossa, 2006

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: rev. Soc.Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory Rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* committee on the reformulation of the AIN-76 a Rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.2, p.467-472, 1993

RISSO, S.; ESCUDERO, C.; ESTEVAO, S.; DE PORTELA, M.L.; FAJARDO, M.A. Chemical composition and seasonal fluctuations of the edible green seaweed *Monostroma undulatum*, Wittrock, from the Southern Argentina coast. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.53, n.3, p. 306-311, 2003.

RODRIGUES, J. A.G. *et al.* Avaliação Do Potencial Anticoagulante De Polissacarídeos Sulfatados De Macroalgas Marinhas. **Rev. Bras. Eng. Pesca**, v.5, n.1, p. 56-69, 2010.

RORRER, G.L. & CHENEY, D.P. Bioprocess engineering of cell and tissues culture for marine seaweeds. **Acquacultural engineering**, v. 32, p11-41, 2004.

SANTOS, C. H. A. *et al.* **Aspectos de Cultivo de algas marinhas com vistas a sustentabilidade da atividade**. Disponível em:< <http://www.zoo.feis.unesp.br/material-didatico>> Acesso em 20 de setembro de 2011.

SILVA, F.R.F. **Estudo Comparativo de carreganas comerciais Kappa, Iota e Lambda no processo inflamatório em ratos: edema, intraplantar e pleurisia**. Dissertação (Mestrado), Universidade federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005

SMIRCKI – TJARDES, M. R. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total – trach nutriente digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations , and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **J Anim Sci**, 2003.

- SOUZA, Bartolomeu WS, 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
- STEFE, C. A. et al. Probiótico, Prebiótico e Simbiótico – Artigo de Revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**. v.3, n.1, p. 16-33, 2008.
- SUBBA R. G; LAKSHMI P; MANJULA, E. Antimicrobial activity of seaweeds *Gracillaria*, *Padina* and *Sargassum* *sps.* on clinical and Phytopathogens. **International Journal of Chemical and Analytical Science**. v.1; n.6; p.114-117, 2010
- SUBBA R. G; LAKSHMI P; MANJULA, E. Antimicrobial activity of seaweeds *Gracillaria*, *Padina* and *Sargassum* *sps.* on clinical and Phytopathogens. **International Journal of Chemical and Analytical Science**. V.1; n.6; p.114-117, 2010
- TEIXEIRA, V. L. Produtos de Algas Marinhas Bentônicas. **Rev. Virtual Química**, n,5, v.3,p. 343-362, 2013
- URSI, S.; PLASTINO, E.M. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. **Rev. bras. Bot.**, v.24, n.4, p.587-594, 2001.
- VIDOTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**. 2004.
- WILSON, S. Nutritional value of detritus and algae in blenny territories on the Great Barrier Reef. In: ARAUJO, L. *et al.*. Efecto tóxico del extracto de alga roja *Gracilaria Mammillaris* en células mononucleares humanas de sangre periférica. **Rev. Faculdade de Farmácia**, v. 46. N1, p.47-50, 2004.



## ARTIGO

### CONSUMO DA ALGA *GRACILARIA BIRDIAE* BENEFICIA PARÂMETROS RELACIONADOS A SAÚDE INTESTINAL E PERFIL LIPÍDICO DE TECIDOS DE ROEDORES EM CRESCIMENTO

#### RESUMO

A busca por alternativas fontes de fibras alimentares é crescente devido aos inúmeros benefícios relacionados à esse componente da dieta. Nesse sentido a *Gracilaria birdiae* torna-se um objeto importante de pesquisa por ser fonte de polissacarídeos pouco digeríveis pelas enzimas do trato gastrointestinal. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do consumo da *Gracilaria birdiae* em parâmetros de crescimento, bioquímicos e de saúde intestinal de ratos wistar recém desmamados. Os animais foram divididos em 3 grupos que receberam as seguintes dietas por 4 semanas: dieta controle; dieta com substituição parcial da fibra da dieta por *G. birdiae* (AP50) e dieta com substituição total da fibra da dieta por *G. birdiae* (AP100). Os animais dos grupos testes apresentaram maior consumo alimentar e mesmo ganho de peso em relação ao controle. O grupo AP100 apresentou maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados no tecido adiposo e menor presença de ácidos graxos com propriedades aterogênicas que o controle em todos os tecidos. Não houve diferença na concentração total de ácidos graxos voláteis, mas a presença da alga influenciou na composição destes, principalmente de acetato. A substituição parcial da fibra da dieta por algas foi suficiente para provocar aumento das camadas musculares no duodeno, cólon e ceco. Maior comprimento de mucosa e criptas foram observados no ceco e colon dos grupos AP50 e AP100. Não foram observados efeitos hepatotóxicos. Os grupos testes apresentaram maior volume cecal e fezes mais úmidas. Assim, o consumo da alga *G. birdiae* parece influenciar positivamente a composição de ácidos graxos dos tecidos e está relacionada ainda à modulação benéfica na morfologia intestinal.

**Palavras chave:** *Gracilaria birdiae*; algas marinhas; fibras alimentares; ácidos graxos.

## **ABSTRACT**

### **CONSUMPTION OF G. BIRDIAE BENEFITS PARAMETERS RELATED TO INTESTINAL HEALTH AND LIPID PROFILE OF RODENT'S GROWING TISSUES**

The search for alternative sources of dietary fiber is growing due to the numerous benefits associated to this component of the diet. In this sense the *Gracilaria birdiae* becomes an important object of research as source of polysaccharides little digestible by enzymes in the gastrointestinal tract. The aim of the study was to evaluate the effect of consumption of *Gracilaria birdiae* in growth parameters, biochemical and intestinal health weanling Wistar mouse. The animals were divided into 3 groups which received the following diets for 4 weeks: control diet; diet with partial replacement of dietary fiber by *G. birdiae* (AP50) and diet with total replacement of dietary fiber by *G. birdiae* (AP100). The animals of test groups showed higher food consumption and even weight gain compared to control. The AP100 group had a higher concentration of polyunsaturated fatty acids in the adipose tissue and presence lower of fatty acids with atherogenic properties than the control in all tissues. There was no difference in the total concentration of volatile fatty acids, but the presence of algae influenced the composition of these, especially acetate. The partial replacement of the fiber diet by algae was sufficient to cause increased muscle layers at the duodenum, colon and cecum. Larger length of mucosa and crypt were observed in the cecum and colon of AP50 and AP100 groups. There were no hepatotoxic effects. The test groups had higher cecal volume and wetter feces. Thus, consumption of seaweed *G. birdiae* seems to positively influence the fatty acid composition of tissues and is also related to the beneficial modulation of the intestinal morphology.

*Key – words: Gracilaria birdiae; seaweeds; fiber; fatty acids*

# 1. INTRODUÇÃO

A influência positiva das fibras alimentares na modulação dos determinantes da saúde intestinal está cada vez mais consolidada (YASMIN et al, 2015). Embora já esteja comprovado a importância dos alimentos fontes de fibra como constituinte da dieta na prevenção e tratamento de doenças como dislipidemias, diabetes tipo 2 e obesidade, o consumo inadequado de fibras ainda é realidade no Brasil (IBGE, 2010) e em países desenvolvidos como os Estados Unidos (KING et al, 2012).

Nesse contexto, investigar alimentos alternativos ou ingredientes alimentares fontes de fibras torna-se uma estratégia interessante para melhorar a oferta desse nutriente, aumentando suas possibilidades de consumo.

Diante desse cenário, as macroalgas marinhas ganham destaque, visto que são crescente os estudos que investigam e comprovam o efeito funcional das mesmas, atribuindo seus benefícios principalmente ao conteúdo de fibras alimentares e seus componentes bioativos (MOHAMED, HASHIM, RAHAMAN, 2012; BOCANEGRA et al, 2009). A heterogeneidade dos organismos vegetais encontrados no grupo das algas é grande, sendo que as três principais divisões de macroalgas compreendem as algas vermelhas (divisão *Rhodophyta*), as algas pardas (divisão *Phaeophyta*) e as algas verdes (divisão *Chlorophyta*) (RORRER & CHENEY, 2004).

Um dos componentes mais explorados nas algas marinhas são os hidrocolóides que se constituem por biopolímeros hidrofílicos de alto peso molecular. Das algas vermelhas, em especial às do gênero *Gracilaria*, são extraídos polissacarídeos sulfatados como o ágar, componente que chega a representar mais de 70% da biomassa algal, sendo formado por frações de agarose e agarpectina e que têm importante valor comercial, principalmente pela utilização como agente espessante e geleificante na indústria de alimentos (MOTA, 2011).

O gênero *Gracilaria spp.* é um dos maiores gêneros de macroalgas cultiváveis no mundo devido ao seu alto rendimento para fins comerciais (FAO, 2014, SOUZA et al, 2012). A espécie *Gracilaria birdiae* tem um cultivo relevante na costa do Brasil, significando matéria prima de importância política, social e econômica (BEZERRA et al, 2010). Quanto ao consumo e visão da *Gracilaria birdiae* para fins alimentícios, nota-se que essa prática é marginal, sendo comum apenas, em pequenas comunidades maricultoras (BEZERRA, 2008).

Apesar de não haver estudos sobre o consumo da *Gracilaria birdiae* e seu impacto na saúde, são encontrados pesquisas com seu principal componente - o ágar. Um estudo conduzido com mulheres japonesas durante 12 semanas que consumiam um produto a base de ágar 15 minutos antes da refeição principal, demonstrou que o ágar auxiliou na perda de peso, diminuição significativa da gordura corporal e dos níveis séricos de colesterol total (MAEDA et al, 2005). Em animais, Chan e colaboradores (2014) demonstraram que o consumo da alga *Gracilaria changii* auxiliou no controle de peso e redução do níveis de colesterol sérico em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas, atribuindo esse efeito à qualidade da fibra presente nessa alga (CHAN et al, 2014).

Embora muitas pesquisas demonstrem o efeito biológico dos componentes isolados presentes nas algas marinhas do gênero *Gracilaria* (FIDELIS et al, 2014; SILVA et al, 2012; ALMEIDA et al, 2011), poucos estudos avaliam o consumo integral da alga bem como elucidam o seu impacto no metabolismo biológico e os possíveis mecanismos envolvidos (BU, KWON, SUNG, 2014).

Assim, considerando que a presença de macroalgas marinhas na alimentação já esteja consolidada em países orientais como China e Japão, e que tal prática na cultura ocidental é crescente e promissora (AMBROSOVA et al, 2014), avaliar o consumo integral bem como o efeito funcional das algas em organismo *in vivo*, contribui de forma sistemática para um estímulo ao cultivo e consumo de tal matéria prima. Nesse contexto o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da substituição total e parcial da fibra da dieta por macroalga *Gracilaria birdiae* nos parâmetros de crescimento, bioquímicos e de saúde intestinal de ratos wistar recém desmamados.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Todos os procedimentos descritos foram conduzidos segundo as Normas Brasileiras de Experimentação Animal e submetido e aprovado à Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa com N° protocolo 24/2013.

As algas utilizadas nesse estudo foram cultivadas na praia de Rio do Fogo, litoral do Rio Grande do Norte, entre as coordenadas 05°15' 49" S e 35°23' 03" W. A coleta do material foi realizada sob maré baixa e em pontos diversificados. Após a seleção, as amostras foram lavadas, desidratadas, embaladas e armazenadas para análises no Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

## 2.1 Desenho experimental e dieta dos animais

Vinte e quatro ratos machos *Wistar* recém desmamados, com 21 dias de idade, foram alocados em gaiolas individuais e mantidos em ambiente de temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e luz controladas, em ciclo claro-escuro de 12 h. Todos os ratos receberam ração comercial e água *ad libitum* por um período de 3 dias para adaptação. Após este período os animais foram pesados e divididos em três grupos com oito animais cada, de forma sistemática, de maneira que a diferença de peso entre os grupos fosse a mínima possível.

A composição das dietas foi baseada na AIN-93G, proposto por Reeves, Nielsen e Fahey (1993). A partir da composição da dieta determinamos os grupos do estudo: O grupo controle representa a dieta padrão (5% de celulose); o grupo teste AP50 (2,5% celulose + 2,5% de *Gracilaria birdiae*) consiste na substituição parcial (50%) da fibra da dieta (celulose) por alga marinha; e o grupo teste AP100 (5% de *Gracilaria birdiae*) possui a macroalga em substituição total (100%) à celulose.

O ingredientes que compõe a dieta estão listados na tabela 1. Durante 28 dias de experimento os animais tiveram acesso as dietas experimentais e água deionizada *ad libitum*. A ingestão alimentar e o peso dos animais foram mensurados semanalmente.

**Tabela 1:** Formulação das dietas experimentais (g/100g de dieta)

Ingredientes	Dietas		
	Controle	AP50	AP100
Alga <i>Gracilaria birdiae</i> em pó <sup>1</sup>	0	6,5	13,1
Caseína	13,2	12,8	12,3
Maltodextrina	13,2	13,2	13,2
Sacarose	10	10	10
Celulose	5	2,5	0
Óleo de Soja	7	6,9	6,8
Mix Mineral AIN93G	3,5	3,5	3,5
Mix Vitaminas AIN93G	1	1	1
L- Cistina	0,3	0,3	0,3
Bitartarato de Colina	0,25	0,25	0,25
Amido de Milho	46,55	43,05	39,55

Adaptação à dieta padrão AIN-93G. AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga. <sup>1</sup> composição química *G. birdiae*: 70,97% carboidratos, 38,26% fibras ( 22,14% solúvel e 16,12% insolúvel); 4,69% proteínas; 1,2% lipídeos; 8,62% minerais.

## 2.2 Coleta das Amostras

No 28º dia de experimento, foi realizado a última pesagem dos animais e os mesmos foram anestesiados com Isoflurano®. A eutanásia aconteceu por punção cardíaca para a coleta das amostras sanguíneas. O conteúdo sanguíneo coletado em tubo com gel e tubo heparinizado foi centrifugado por 30 minutos a 3500 rpm para coleta do soro e plasma. O fígado, tecido adiposo visceral e ceco foram retirados, pesados e imediatamente congeladas sob nitrogênio líquido. O conteúdo cecal foi retirado para determinação da umidade e ácidos graxos voláteis. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a temperatura de -80°C até o momento das análises.

Para as análises histológicas foram coletados pequenos fragmentos do fígado, intestino delgado (porção proximal do duodeno) e intestino grosso (porção distal do colón e ceco). Os fragmentos foram coletados, lavados com tampão fosfato salino (PBS), acondicionados em solução formalina 10% por um período de 48 horas, e preservados em álcool 70% até o momento da análise.

### *2.3 Análise do Perfil de Ácidos Graxos*

A extração de lipídeos do fígado, tecido adiposo visceral e plasma foi realizada segundo a técnica proposta por FOLCH et al (1957) e a esterificação dos ácidos graxos seguiu o protocolo descrito por Hartman & Lago (1973). A identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos foram obtidas por meio de análises em cromatógrafo gasoso CG – 17 SHIMADZU® de alta resolução, acoplado com detector de ionização de chama. A separação ocorreu em coluna capilar Carbowax marca SUPELCO®, (30 m x 0,25 mm) As amostras de ésteres metílicos (1,0 µL) foram introduzidas em um injetor tipo split = 10 a 230°C, utilizando como gás de arraste o nitrogênio. As temperaturas iniciais e finais da coluna foram, respectivamente, de 140 e 240 °C, com uma rampa intermediária de 4°C/min. A temperatura do detector foi mantida em 240°C. Os cromatogramas foram registrados em software próprio.

Os ácidos graxos foram identificados por meio da comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com os padrões de ésteres metílicos injetados sob as mesmas condições. Os resultados dos ácidos graxos foram expressos em percentual de área (%).

#### *2.4 Umidade Fecal e Ácidos Graxos Voláteis*

A umidade fecal foi determinada por gravimetria das amostras de fezes antes e após secagem em estufa a 105° C por 24 horas (AOAC, 2005). O resultado foi expresso em percentual de umidade.

Já os ácidos graxos voláteis presentes no conteúdo cecal foram extraídos utilizando a metodologia proposta por Smircki – Tjardes (2003) com ácido metafosfórico a 25%. A análise e identificação dos AGV foi realizada em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), marca SHIMADZU®, Detector modelo SPD-20A VP acoplado ao Detector Ultra Violêta (UV) com comprimento de onda de 210nm. Para a análise, foram injetadas 20µL da amostra. Os compostos foram separados e identificados pela coluna EC nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel® (250cm x 4.6mm), utilizando como fase móvel água ultrapura e Ácido Meta Fosfórico, grau HPLC na proporção de 99:1. A temperatura do forno foi de 30 °C com vazão de fluxo: 0,6 mL. min<sup>-1</sup>. Aquisição de dados foi realizada pelo software Lab Solutions, Shimadzu Corporation (2013) e os resultados foram expressos em mmol/g fezes.

#### *2.5 Análises Bioquímicas*

Foram investigados no soro dos animais os níveis de glicose, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, creatinina e ácido úrico. Todas as análises foram realizadas utilizando kits comerciais Bioclin Quibasa® seguindo as informações do fabricante em aparelho Cobas Mira Plus®. Os resultados foram expressos em mg/dL para glicose, creatinina e ácido úrico e em U/L para atividade enzimática e funcional do fígado (fosfatase alcalina, ALT e AST).

#### *2.6 Análises Histológicas*

Para as análises histológicas, fragmentos do fígado, duodeno, colon e ceco foram fixados em solução de formalina a 10% por 48 horas em temperatura ambiente. Após fixação foram desidratados sob gradiente crescente de etanol e incluídos em resina a base de hidroximetilmetacrilato (Hisloresin® Leica). Doze secções transversais de cada tecido/ animal foram obtidas em micrótomo rotativo com navalhas de vidro e coradas com Azul de Toluidina para morfometria. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan (Merck®).

### *2.6.1 Morfometria Hepática*

Secções histológicas do fígado de cada animal foram selecionadas aleatoriamente para análise. As imagens foram obtidas em fotomicroscópio com câmara digital acoplada, utilizando-se objetiva de 40x e resolução de 1600x1200 pixels. Foram analisadas 80 imagens de cada grupo, sendo contabilizado pontos sobre núcleo, citoplasma, capilares sinusóides e gotículas de gordura.

A contagem dos parâmetros nos campos selecionados foi realizada com o auxílio do Software Image Pro-Plus® versão 4.5. Padronizamos a sobreposição de uma matriz retangular (19 linhas e 14 colunas) nos campos fotografados de forma que totalizasse uma contagem final de 266 pontos. Foram contabilizados apenas as estruturas presentes nos pontos coincidentes às interseções. Os resultados foram expressos em percentual (%).

### *2.6.2 Morfometria Intestinal*

Os fragmentos do duodeno proximal foram analisados através da objetiva de aumento de 4X e resolução de 1600x1200 pixels. Foi mensurado as medidas referentes ao tamanho das camadas musculares, submucosa e mucosa; comprimento das vilosidades intestinais, bem como diâmetro da base e do ápice da vilosidade, e o comprimento e diâmetro das criptas.

Já para a morfometria do colón e ceco foi utilizado a objetiva de 10X no qual foi também mensurado as camadas musculares, submucosa e mucosa, bem como o comprimento e diâmetro das criptas.

Foram retiradas no mínimo 80 medidas de cada parâmetro por grupo experimental. Estas medidas foram feitas utilizando-se régua micrométrica acoplada à ocular de microscópio de luz. Para análise foi utilizado o programa Image Pró Plus®, versão 4.5 calibrado.

## *2.7 Análises Estatísticas*

As análises foram submetidas ao teste de normalidade e posteriormente à análise de variância (ANOVA). Quando significativa realizou-se o teste de comparação entre medias de Turkey. Foi adotado  $\alpha=5\%$ . A análise estatística e representação dos dados aconteceu com o auxílio do software SPSS® versão 20.0.



### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da dieta no ganho de peso, consumo alimentar e peso tecidual dos animais

Durante as 4 semanas de experimento, os animais não apresentaram anormalidades quanto a saúde ou sinais patológicos. Não foi verificado presença de episódios de diarreia ou qualquer disfunção do trato gastrointestinal que poderia influenciar no consumo alimentar e conseqüentemente ganho de peso dos animais.

Os resultados referente a densidade calórica das dietas, consumo alimentar, ganho de peso, coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e peso tecidual dos animais podem ser visualizados na tabela 2. As dietas experimentais foram isocalóricas conforme o planejado, e os animais apresentaram o mesmo peso inicial, não sendo assim, variáveis de influência.

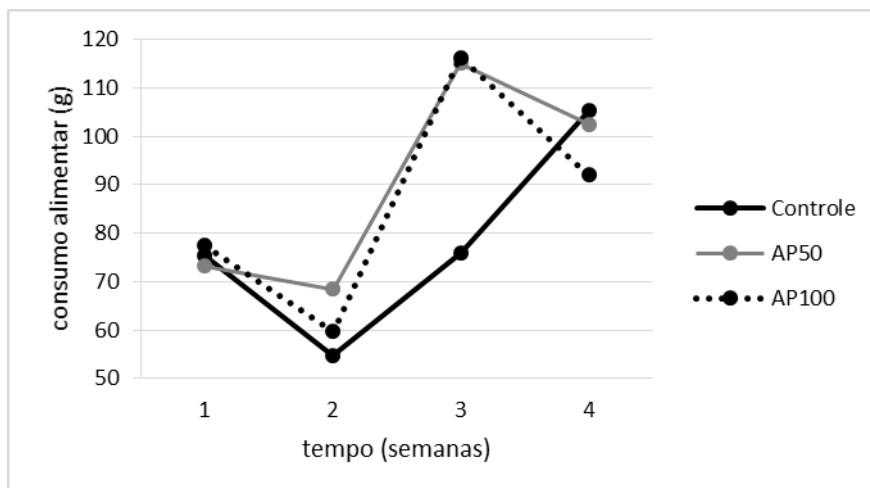
**Tabela 2:** Ganho de Peso, Consumo alimentar, coeficiente de eficiência alimentar (CEA), densidade calórica das dietas e peso dos órgãos dos grupos controle, AP50 e AP100

Parâmetros	Controle	AP50	AP100
Peso Inicial (g)	58,12 ±9,7	58,37 ±8,6	58,12 ±8,4
Peso Final (g)	176,71 ±21,5	172,25 ±21,8	164,42 ±17,2
Ganho de Peso (g)	116,50 ± 17,9	113,80 ±24,6	99,63 ±25,1
Consumo alimentar (g/dia)	11,49 ±1,2 <sup>b</sup>	13,45 ±1,4 <sup>a</sup>	13,97 ±0,95 <sup>a</sup>
Consumo alimentar total (g)	321,69 ± 34,1 <sup>b</sup>	376,52 ±40,6 <sup>a</sup>	391,21 ±26,7 <sup>a</sup>
CEA	0,36 ±0,07 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,05 <sup>b</sup>
Densidade Calórica (kcal/g)	3,9	3,8	3,8
Peso dos órgãos (g/100g de PC)			
Tecido adiposo visceral (g)	4,50 ±0,30	4,77 ±0,36	4,52 ±0,27
Fígado (g)	4,14 ±0,79	3,63 ±0,80	2,98 ±1,47

AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga.

PC= peso corporal. Valores demonstrados em média ± desvio padrão (n=8./grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05)

Ao se avaliar o consumo alimentar e o ganho de peso, notamos que embora os grupos testes tenham apresentado maior consumo alimentar em relação ao controle (p <0,05), não houve diferença entre o ganho de peso para todos os grupos (p >0,05). Na quarta semana de experimento, houve uma diminuição do consumo alimentar pelos grupos testes (Figura 1), entretanto o mesmo não foi suficiente para gerar diferença significativa da ingestão.



**Figura 1: Ingestão alimentar e ganho de peso semanal** de ratos alimentados com dieta controle; dieta com 50% de substituição de fibra da dieta por algas (AP50) e dieta com 100% de substituição de fibra da dieta por algas (AP100).

Nessa perspectiva, o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) do grupo controle foi maior em relação aos grupos testes, o que demonstra que a presença das algas na dieta dos roedores interferiu na capacidade da mesma em promover ganho de peso.

Ao avaliarmos o peso dos órgãos, tanto o tecido adiposo visceral quanto o fígado, não encontramos diferenças significantes.

#### *4.2 Influência da dieta no perfil de ácidos graxos do tecido adiposo, hepático e plasma*

As alterações no perfil lipídico tecidual dos animais pode ser visualizado na tabela 3. É válido salientar que na análise dos dados acerca do perfil de ácidos graxos foi verificado semelhança entre as triplicatas e repetições, ratificando a obtenção de um padrão acerca do perfil lipídico pertinentes a cada tecido.

**Tabela 3:** Concentração (%) de ácidos graxos do tecido adiposo, fígado e plasma de animais alimentados com dietas controle, AP50 e AP100

<b>Ácidos Graxos (%)</b>	<b>Controle</b>	<b>AP50</b>	<b>AP100</b>
<i>(a) Tecido Adiposo</i>			
C 12:0	0,2 ±0,1	0,2 ±0,1	0,2 ±0,0
C 14:0	1,56 <sup>a,b</sup> ±0,3	1,71 <sup>a</sup> ±0,1	1,47 <sup>b</sup> ±0,1
C 16:0	24,67 <sup>a</sup> ±5,0	21,49 <sup>b</sup> ±1,9	19,42 <sup>b</sup> ±1,7
C 16:1	6,6 ±1,5	5,6 ±0,8	5,5 ±1,0
C 18:0	1,83 <sup>a,b</sup> ±0,5	2,05 <sup>a</sup> ±0,2	1,45 <sup>b</sup> ±0,4
C 18:1 n9	37,27 <sup>b</sup> ±7,4	44,12 <sup>a</sup> ±2,3	39,12 <sup>b</sup> ±2,2
C 18:2 n6	26,71 <sup>b</sup> ±5,3	24,00 <sup>c</sup> ±2,0	31,50 <sup>a</sup> ±2,6
C 18:3 n6	1,11 <sup>a,b</sup> ±0,3	0,86 <sup>b</sup> ±0,2	1,31 <sup>a</sup> ±0,4
Saturado	28,27 <sup>a</sup> ±1,7	25,46 <sup>b</sup> ±2,7	22,55 <sup>c</sup> ±2,4
Monoinsaturado	43,9 <sup>b</sup> ±2,0	49,73 <sup>a</sup> ±2,1	44,63 <sup>b</sup> ±2,3
Poliinsaturado	27,83 <sup>b</sup> ±1,7	24,89 <sup>b</sup> ±2,8	32,82 <sup>a</sup> ±3,7
<i>(b) Fígado</i>			
C 14:0	0,42 ±0,1	0,47 ±0,1	0,34 ±0,1
C 16:0	23,74 ±1,0	22,97 ±1,1	24,24 ±2,6
C 16:1	1,54 <sup>a</sup> ±0,3	1,27 <sup>a</sup> ±0,2	0,83 <sup>b</sup> ±0,2
C 18:0	11,79 <sup>b</sup> ±0,7	12,29 <sup>b</sup> ±2,1	16,46 <sup>a</sup> ±2,2
C 18:1 n9	21,61 <sup>a</sup> ±2,2	19,2 <sup>a,b</sup> ±2,2	17,55 <sup>b</sup> ±1,6
C 18:2 n6	26,45 ±1,8	26,70 ±3,1	26,09 ±1,8
C 18:3 n6	0,76 <sup>b</sup> ±0,0	0,67 <sup>b</sup> ±0,1	0,22 <sup>a</sup> ±0,1
C 20:4n6	13,68 ±1,9	16,44 ±2,3	14,29 ±2,9
Saturado	35,88 <sup>b</sup> ±1,1	35,73 <sup>b</sup> ±3,3	40,49 <sup>a</sup> ±5,5
Monoinsaturado	23,3 <sup>a</sup> ±3,4	20,47 <sup>a,b</sup> ±2,7	18,14 <sup>b</sup> ±2,5
Poliinsaturado	40,8 ±4,2	43,8 ±2,4	41,36 ±4,9
<i>(c) Plasma</i>			
C 14:0	3,33 <sup>b</sup> ±1,9	3,45 <sup>a,b</sup> ±0,8	5,69 <sup>a</sup> ±3,8
C 16:0	40,34 ±6,4	45,89 ±2,6	38,65 ±7,9
C 18:0	25,21 <sup>b</sup> ±2,7	26,22 <sup>a</sup> ±1,8	28,70 <sup>a</sup> ±1,7
C 18:1 n9	13,64 ±1,1	15,56 ±4,9	14,70 ±5,9
C 18:3	2,53 <sup>b</sup> ±1,4	3,55 <sup>b</sup> ±1,2	8,67 <sup>a</sup> ±4,0
C 20:4 n6	14,98 <sup>a</sup> ±6,8	5,34 <sup>a,b</sup> ±3,6	3,58 <sup>b</sup> ±4,0
Saturado	68,86 ±10,0	75,54 ±4,4	73,03 ±9,4
Monoinsaturado	13,64 ±1,1	15,56 ±4,9	14,70 ±5,9
Poliinsaturado	17,50 <sup>a</sup> ±6,8	8,89 <sup>b</sup> ±4,3	12,27 <sup>a,b</sup> ±6,5

---

AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga. Valores demonstrados em média  $\pm$  desvio padrão (n=8./grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p<0,05$ ).

### *Tecido Adiposo*

No perfil de ácidos graxos do tecido adiposo, observamos que os ácidos graxos saturados estiveram em maior concentração no grupo controle quando comparado aos grupos testes, sendo essa relação influenciada pelo teor de alga consumida.

Quando observamos o ácido graxo predominante no grupo de saturados, temos que o ácido palmítico (C16:0) é o principal, uma vez que detectamos que o mesmo representa 24,7% dos lipídeos do tecido adiposo no grupo controle sendo essa concentração maior ( $p< 0,05$ ) que nos grupos testes AP50 e AP100. Não houve diferença entre a concentração de ácido palmítico entre os grupos testes.

No somatório de ácidos graxos poli-insaturados só foi possível verificar alteração no grupo teste AP100, em especial para o ácido graxo linoleico (C18:2 n6), uma vez que este foi encontrado em maior concentração nesse grupo, representando quase 32% do total de ácidos graxos do tecido adiposo visceral.

No que se refere ao somatório dos ácidos monoinsaturados notamos que o grupo com substituição parcial de algas marinhas – AP50 foi o grupo que apresentou maior concentração ( $p<0,05$ ) desses ácidos graxos, principalmente do ácido oleico (18:1 n9). Não houve diferença entre o somatório de ácidos graxos monoinsaturados e de ácido oleico entre o grupo controle e o grupo AP100 ( $p>0,05$ ).

### *Fígado*

Ao avaliarmos o perfil de ácidos graxos do fígado, notamos que os achados foram diferentes em relação ao tecido adiposo, uma vez que o grupo teste AP100 apresentou maiores teores de ácido graxo saturado ( $p<0,05$ ), enquanto os grupos controle e AP50 não apresentaram diferença para esse parâmetro. Ao observarmos o lipídeo majoritário dentre os saturados, temos que o ácido esteárico (C18:0) é o principal representante, sendo sua concentração maior no grupo com 100% de substituição de fibra da dieta por algas ( $p<0,05$ ).

Os grupos controle e AP50 apresentaram maiores teores de monoinsaturados, em especial para o ácido oleico (C18:1 n9) e também palmitoléico (C16:1), entretanto a concentração deste último é pequena (menor que 2% da amostra).

Não houve diferença na concentração de ácidos graxos poli-insaturados ( $p > 0,05$ ).

#### *Plasma*

O ácido graxo saturado predominante no plasma de todos os grupos foi o ácido palmítico (C16:0). Houve diferença na concentração de ácido esteárico (C18:0) com maior concentração destes no grupo teste; e ácido mirístico(14:0) que, embora estivesse em menor concentração em relação aos demais ácidos graxos saturados, foi constatado em maior proporção no grupo teste AP100 ( $p < 0,05$ ).

Não detectamos diferenças estatísticas entre os tratamentos ao avaliarmos o somatório de ácidos graxos saturados e monoinsaturados ( $p > 0,05$ ). Já os poli-insaturados estiveram em maior concentração no grupo teste AP100 ( $p < 0,05$ ).

É válido destacar que o ácido poli-insaturado encontrado em maior quantidade no grupo teste AP100 foi o ácido  $\gamma$  –linolênico (C18:3 n6), enquanto o ácido araquidônico (C20:4) por sua vez, esteve em maior concentração no grupos controle e AP50.

### *3.3 Influência da dieta no teor umidade e nitrogênio fecal, peso do ceco e ácidos graxos voláteis*

Ao avaliar o efeito do consumo das algas nos parâmetros de fezes e ceco, notamos que o grupo AP100 apresentou ceco vai volumoso em relação ao grupo demais grupos ( $p < 0,05$ ). Para umidade fecal, notamos que a substituição parcial das fibras da dieta por alga já foi suficiente para aumentar a umidade fecal, apresentando os grupos testes fezes mais úmidas que o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4:** Umidade fecal, Nitrogênio fecal, peso do ceco e ácidos graxos voláteis do conteúdo cecal de animais alimentados com dietas controle, AP50, AP100

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle</b>	<b>AP50</b>	<b>AP100</b>
Umidade Fecal (%)	10,16 ±3,9 <sup>b</sup>	25,30 ±7,6 <sup>a</sup>	31,60 ±6,2 <sup>a</sup>
Nitrogênio Fecal (g)	0,63 ±0,15 <sup>a,b</sup>	0,40 ±0,24 <sup>b</sup>	0,90 ±0,37 <sup>a</sup>
Peso do ceco (g)	2,34 ±0,5 <sup>b</sup>	2,42 ±0,8 <sup>b</sup>	3,45 ±0,9 <sup>a</sup>
<b>Ácido Graxo Volátil</b>			
Acético ( $\mu\text{mol/g fezes ceco}$ )	60,67 ±5,6 <sup>a</sup>	38,95 ±9,1 <sup>b</sup>	47,4 ±18,9 <sup>a,b</sup>
Propiônico ( $\mu\text{mol/g fezes ceco}$ )	85,17 ±18,8	82,19 ±17,7	94,89 ±25,3
Butírico ( $\mu\text{mol/g fezes ceco}$ )	nd	nd	nd
Razão ac acetato:propiônico	0,72 ±0,3	0,50 ±0,1	0,53 ±0,3
Somatório ( $\mu\text{mol/g fezes ceco}$ )	149,47 ±17,9	112,56 ±19,85	143,49 ±32,60

AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga. nd = não detectado. Valores demonstrados em média ± desvio padrão (n=8/grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

Detectamos maior excreção de nitrogênio nas fezes do grupo teste AP100, enquanto para os demais grupos esse parâmetro não diferiu. Acerca do perfil de ácidos graxos voláteis, nota-se que só foi encontrado diferença significativa no teor de ácido acético, sendo maior concentração encontrada nos grupos controle e AP100 (p>0,05) e menor concentração encontrada no grupo AP50. Quando avaliamos a razão molar entre ácido acético e ácido propiônico não encontramos diferença entre os grupos. O ácido butírico não foi detectado em nenhum dos grupos. Embora não tenhamos encontrado diferenças significantes entre os grupos quanto à quantidade total de ácidos graxos voláteis é válido relatar que durante o procedimento analítico, as amostras referente ao grupo AP100 foram as que demonstraram maior produção de gás levando a intercorrência nas análises como grande formação de bolhas no homogenato e extravasamento da amostra no recipiente de análise (ependorf).

### 3.4 Perfil Bioquímico

Em todos os parâmetros mensurados no soro dos animais, não houve diferença estatística (p>0,05). É válido salientar que para verificar a influência e a possível toxicidade do consumo de algas foi investigado os níveis de creatinina, ácido úrico e as enzimas hepáticas ALT e AST. Encontramos também que o consumo de algas na substituição parcial e total, não diferenciou os níveis de glicose em jejum em relação ao controle.

**Tabela 5:** Perfil Bioquímico de animais alimentados com dietas controle, AP50, AP100

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>AP50</b>	<b>AP100</b>
Glicemia jejum (mg/dL)	192,38 ± 54,9	215,63 ± 55,1	207,57 ± 35,9
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,05	0,50 ± 0,08	0,42 ± 0,05
Ácido Úrico (mg/dL)	1,61 ± 0,95	1,29 ± 0,56	1,58 ± 0,58
Fosfatase Alcalina (U/L)	195,88 ± 60,6	208,8 ± 63,95	206,43 ± 42,7
Aspartato Aminotransferase (AST) (U/L)	102,50 ± 19,50	116,88 ± 29,9	103,86 ± 34,95
Alanina Aminotransferase (ALT) (U/L)	17,75 ± 3,37	18,63 ± 7,25	17,57 ± 3,65

AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga. Valores demonstrados em média ± desvio padrão (n=8./grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

### 3.5 Influência da dieta na morfometria intestinal

As medidas obtidas para cada um dos segmentos do intestino mensurados podem ser visualizadas na tabela 6. As imagens referentes à essa mudança estão na figura 2.

**Tabela 6:** Histomorfometria intestinal de ratos alimentados com dieta controle, AP50 e AP100

<b>Parâmetro (µm)</b>	<b>Controle</b>	<b>AP50</b>	<b>AP100</b>
<b>DUODENO</b>			
<b>Camadas</b>			
Musculares	100,89 <sup>b</sup> ± 10,74	113,31 <sup>a</sup> ± 5,38	102,46 <sup>b</sup> ± 4,42
Submucosa	37,51 ± 2,97	37,87 ± 4,67	38,79 ± 3,29
Mucosa	712,07 ± 63,6	728,37 ± 45,29	666,73 ± 60,2
<b>Vilosidade</b>			
Comprimento	488,04 ± 30,81	603,47 ± 23,26	483,23 ± 41,85
Diâmetro basal	85,04 ± 11,74	87,49 ± 8,99	94,82 ± 14,29
Diâmetro apical	59,94 ± 7,11	57,51 ± 5,02	58,73 ± 4,61
<b>Cripta</b>			
Comprimento	111,43 ± 12,27	109,00 ± 13,32	114,74 ± 11,44
Diâmetro	29,01 ± 3,49	28,28 ± 4,56	29,87 ± 3,69

AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga. Valores demonstrados em média ± desvio padrão (n=8./grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

**Tabela 6(continuação):** Histomorfometria intestinal de ratos alimentados com dieta controle, AP50 e AP100

<b>Parâmetro (µm)</b>	<b>Controle</b>	<b>AP50</b>	<b>AP100</b>
<b>COLÓN</b>			
<b>Camadas</b>			
Musculares	101,63 <sup>b</sup> ±19,7	135,8 <sup>a</sup> ±24,7	135,7 <sup>a</sup> ±16,5
Submucosa	26,8 ±3,55	25,7 ±2,95	29,87 ±4,29
Mucosa	214,06 <sup>b</sup> ±22,41	259,06 <sup>a</sup> ±14,9	239,15 <sup>a</sup> ±19,3
<b>Cripta</b>			
Comprimento	127,93 <sup>b</sup> ±13,51	161,66 <sup>a</sup> ±10,54	143,84 <sup>a</sup> ± 23,52
Diâmetro	24,18 ±2,61	24,06 ±2,84	23,91 ±1,92
<b>CECO</b>			
<b>Camadas</b>			
Musculares	109,37 <sup>c</sup> ±23,2	135,73 <sup>b</sup> ±25,9	165,81 <sup>a</sup> ±15,8
Submucosa	40,13 ±9,03	33,60 ±7,47	43,84 ±13,68
Mucosa	134,67 <sup>b</sup> ±17,8	135,28 <sup>b</sup> ±14,4	162,48 <sup>a</sup> ±19,5
<b>Cripta</b>			
Comprimento	110,92 <sup>b</sup> ±16,5	120,20 <sup>b</sup> ±14,9	135,17 <sup>a</sup> ± 15,3
Diâmetro	31,64 <sup>b</sup> ±3,72	34,72 <sup>a,b</sup> ±4,81	36,48 <sup>a</sup> ±3,11

AP50 = Grupo com substituição 50% da fibra da dieta por alga; AP100 = Grupo com substituição 100% da fibra da dieta por alga. Valores demonstrados em média ± desvio padrão (n=8./grupo). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

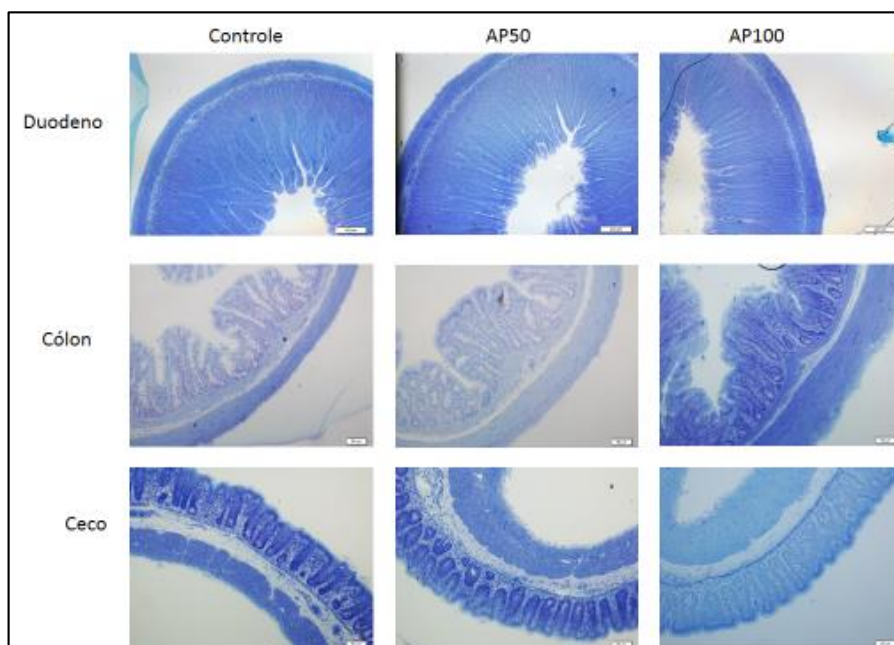
Foi verificado diferença nas camadas musculares em todos os seguimentos intestinais avaliados (p<0,05). No cólon e ceco os grupos testes apresentaram camadas musculares mais espessas em relação ao controle, sendo que no ceco a substituição total da fibra da dieta por algas exerceu maior influência à esse parâmetro que a substituição parcial (p<0,05).

A camada referente a submucosa não apresentou diferença entre os grupos, bem como a altura e tamanho das vilosidades intestinais presentes na porção do duodeno proximal (p>0,05).

O consumo de algas resultou em uma maior mucosa intestinal das porções do cólon e ceco, sendo que no ceco somente o grupo AP100 apresentou diferença em relação ao controle (p<0,05).

A morfometria revelou que criptas de Lieberkühn apresentaram diferença no cólon e ceco, no qual observamos criptas mais profundas nos grupos testes em relação ao controle. Já no ceco, para o grupo AP100, observamos que além de mais profundas, apresentaram maior área em relação ao grupo controle.





**Figura 2: Histomorfologia do duodeno, cólon e ceco** de ratos alimentados com dieta controle; dieta com 50% de substituição de fibra da dieta por algas (AP50) e dieta com 100% de substituição de fibra da dieta por algas (AP100).

### 3.6 Influência da dieta na morfometria hepática

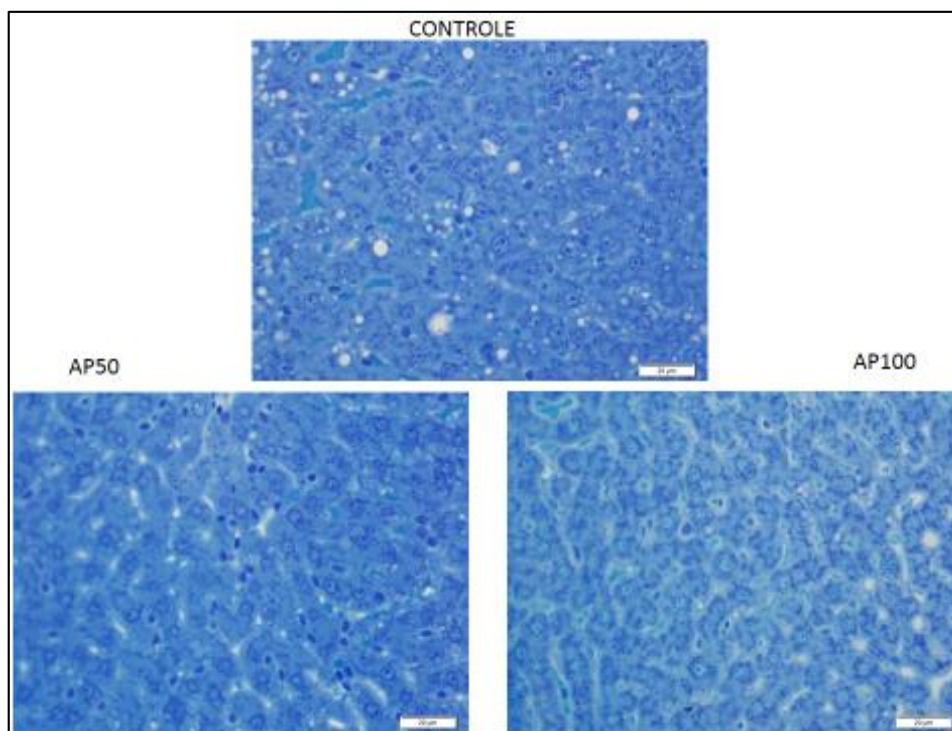
Não foram encontrados diferenças entre os grupos quanto ao número de hepatócitos na área analisada ( $p > 0,05$ ). Ao avaliarmos a capilaridade do tecido, notamos que o fígado dos grupos testes apresentaram maior número de vasos. Quanto a presença de gotículas de gordura no tecido, notou-se maior presença destas no grupo controle em relação aos grupos testes ( $p < 0,05$ ). A histologia do fígado pode ser visualizado na figura 3.

**Tabela 7:** Efeito do consumo de algas *Gracilaria birdiae* na histomorfometria hepática de ratos wistar

Parâmetros (%)	Controle	AP50	AP100
Núcleo	10,79 ± 0,89	9,96 ± 1,79	12,15 ± 1,11
Citoplasma	64,05 ± 6,84	56,53 ± 6,68	56,62 ± 4,71
Capilares Sinusóides	16,98 <sup>b</sup> ± 4,10	26,51 <sup>a</sup> ± 3,87	27,77 <sup>a</sup> ± 5,14

Células de Gordura 8,48<sup>a</sup> ±2,24 7,00<sup>a</sup> ±0,91 3,47<sup>b</sup> ±0,24

---



**Figura 3: Histomorfologia do fígado** de ratos alimentados com dieta controle; dieta com 50% de substituição de fibra da dieta por algas (AP50) e dieta com 100% de substituição de fibra da dieta por algas (AP100).

## 4 DISCUSSÃO

As dietas experimentais revelaram que os animais dos grupos testes apresentaram um maior consumo alimentar em relação ao grupo controle, entretanto quando foi avaliado o ganho de peso, este não diferiu, influenciando nos valores de CEA encontrados. Como todas as dietas apresentaram o mesmo percentual de fibra, podemos inferir que o fator que influenciou a diferença nesses parâmetros foi a qualidade da fibra alimentar presente.

A celulose, fonte de fibra do grupo controle, é uma fibra alimentar insolúvel, pouco fermentada pela microbiota intestinal, formada por ligações glicosídicas  $\beta$  (1-4) (COSTA, MARTINO, 2008). Já o polissacarídeo presente majoritariamente na alga *G. birdiae*, é o ágar, um complexo carboidrato solúvel formado pela fração de polissacarídeos neutros (agarose) com ação geleificante e polissacarídeos ácidos sulfatados (agaropectina), sendo esse, substrato fermentável (O'SULLIVAN et al, 2010). Assim tínhamos que o grupo controle era composto principalmente por fibras insolúveis; grupo AP50 com um balaço entre fibras insolúveis e solúveis e o grupo AP100 composto principalmente por fonte de

fibra solúvel. Como o efeito fisiológico das fibras alimentares são influenciados por fatores como solubilidade e viscosidade, observamos que as fibras presentes nas algas por serem solúveis em água, e mais viscosas que a celulose, podem ter promovido menor contato do substrato digerível ao longo do trato gastrointestinal resultando em menor digestão e absorção de nutrientes (BROCKMAN, CHEN, GALLAHER, 2014), apesar do maior consumo.

A ingestão alimentar aumentada nos grupos testes, principalmente na semana 3 do experimento (Figura 1) pode ter sido influenciada pelo aumento da palatabilidade, visto que as algas são um ingrediente alimentar natural, ao passo que a celulose utilizada para a confecção da dieta é um elemento sintético. Um tempo de adaptação insuficiente pode ter contribuído para um decaimento do consumo na semana 2, entretanto como este fato foi observado em todos os grupos do estudo, diminuindo o viés dessa variável. Embora a ingestão total não tenha apresentado diferença significativa, podemos acompanhar, ao visualizar a figura 1, que na semana 4, houve uma tendência na redução do consumo alimentar pelos grupos testes em relação ao controle, que apresentou um aumento contínuo. Tais dados apontam a influência das algas *G. birdiae* no controle de peso, instigando que a mesma pode ser explorada como elemento de estudo em pesquisas de obesidade.

Um estudo feito por Adan e colaboradores (2014) avaliou o efeito da suplementação (10% de fibra) de diferentes fibras alimentares fermentáveis no ganho de peso e consumo alimentar de ratos jovens durante 4 semanas, e encontrou que os grupos experimentais apresentaram menor consumo e ganho de peso comparado ao controle, havendo aumento dos níveis de hormônios ligados à saciedade. O mesmo estudo aponta que os efeitos da fibra na saciedade por mecanismos hormonais podem estar relacionados ao aumento crônico da ingestão de fibras por um tempo prolongado. Podemos inferir então, que o tempo de observação do experimento pode ter influenciado nesse parâmetro, mas a partir dos dados obtidos podemos observar uma influência positiva das algas no ganho de peso dos animais.

Não foram encontrados estudos que avaliassem o efeito do consumo de algas no perfil de ácidos graxos de tecido adiposo e hepático, sendo esse um parâmetro importante a ser explorado. Não encontramos diferenças quanto ao peso desses tecidos entre os tratamentos (Tabela 2), mas observamos que a presença de algas na dieta influenciou na composição lipídica dos mesmos.

A influência da dieta na atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico como as elongases e dessaturases já é consolidada (ROS et al, 2015), entretanto a influência da fibra alimentar nos mecanismos envolvidos de dietas normolipídicas não é bem elucidado, havendo poucos estudos.

No tecido adiposo o grupo controle apresentou maior concentração de ácidos graxos saturados em relação aos grupos testes, apresentando como ácido graxo majoritário, o ácido palmítico (C16:0). Esse ácido graxo, embora seja o mais abundante na dieta está relacionado a um maior efeito aterogênico por aumentar o LDL colesterol (FAO, 2009). Ambos os grupos testes apresentaram menores concentrações de ácido palmítico no tecido adiposo. Já no tecido hepático observamos uma relação diferente.

O somatório de ácido graxo saturado no fígado, foi maior no grupo teste. Entretanto, ao observar a qualidade dessa composição lipídica, notamos que não houve diferença no ácido palmítico, mas sim, no ácido esteárico (C18:0). O ácido esteárico apresenta, reconhecidamente, menor efeito aterogênico em relação ao mirístico (C14:0) e o ácido palmítico (C16:0), uma vez que as reações de desidrogenação acontecem de forma mais rápida que as etapas de alongamento da cadeia, sendo assim, convertido mais rapidamente a ácido oleico (C18:1 n9) no fígado (FAO, 2009; LOTTEMBERG, 2009; RIOUX, LEMARCHAL, LEGRAND, 2000). O grupo AP100 foi o grupo que apresentou maior concentração de ácido esteárico no fígado, possibilitando inferir que a substituição total da fibra da dieta por algas contribuiu para o aumento de ácidos graxos saturados com menor efeito aterogênico nesse tecido.

Os polissacarídeos sulfatados presentes nas algas *G. birdiae*, mesmo quando isolados, apresentaram elevada atividade antioxidante, agindo por mecanismos que envolvem inibição da infiltração de células inflamatórias e peroxidação lipídica em alguns tecidos com dano induzido (SILVA et al, 2012). A atividade antioxidante ajuda a explicar a maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados no tecido adiposo dos grupos testes.

A relação de ácido oleico: ácido esteárico (C18:1/ C18:0) no fígado está relacionada com a avaliação da atividade da enzima  $\Delta 9$  dessaturase. Essa razão foi maior no grupo controle (1,83) e menor no grupo teste AP100 (1.06). Tal resultado nos permite considerar que a fibra parece influenciar nessa conversão, talvez por aumentar a excreção de lipídeos nas fezes, diminuindo conseqüentemente a absorção deste nutriente (COLINA-COCA et al, 2014).

A via adotada para a síntese do ácido araquidônico foi a via  $\Delta 6$  dessaturase, que segundo Colina – Coca e colaboradores (2014) é a via mais assistida na obtenção desse ácido graxo. Tal inferência é possível, visto que observamos a presença do intermediário  $\gamma$  – linolênico (C18:3 n6) em todos os tecidos analisados. A via de síntese é iniciada pela dessaturação do ácido linoleico (C18:2 n6) à ácido  $\gamma$  – linolênico (C18:3 n6), sofrendo ação da elongase para ácido di-homo-  $\gamma$  -linolenico (C20:3 n6) e então se transforma em ácido araquidônico (C20:4 n6) pela ação da  $\Delta 5$  dessaturase (FAO, 2009). Considerando essa cadeia de reação, parece que a substituição total da fibra da dieta por algas influenciou na ação da  $\Delta 5$  dessaturase, visto que observamos maiores valores do precursor C18:3 n6 no grupo AP100 e menor concentração de ácido araquidônico, principalmente no plasma.

Assim, parece que o consumo de algas influenciou o metabolismo de lipídeos no plasma e nos tecidos adiposo e hepático, porém os mecanismos envolvidos nessa interferência não estão bem elucidados (COLINA-COCA et al, 2014). São necessários mais estudos que investiguem a influência do consumo de fibras, principalmente as solúveis, no perfil de ácidos graxos em tecidos de animais alimentados com dietas normolipídicas.

Nesse estudo observamos que a substituição das fibras da dieta por algas contribuiu para fezes mais úmidas e ceco mais volumoso (Tabela 4). Avaliar o ceco em estudos com fibras e roedores é importante visto que esse é o principal sítio de fermentação nos ratos, enquanto em humanos a fermentação acontece principalmente no cólon (KNAPP et al, 2013). Esses achados são comuns em ratos alimentados com fibras dietéticas (HWANG et al, 2014). Resultados semelhantes foram encontrados por Chan e colaboradores (2014) em que atribuíam o maior bolo fecal nos grupos que receberam a alga *Gracilaria changii* à maior capacidade de retenção de água (WHC) pela fibra presente na alga. Assim, pode-se inferir que as algas *G. birdiae* podem auxiliar na melhora de sintomas ligados à constipação.

A maior retenção de água está relacionada à fermentabilidade das fibras, exercendo um efeito protetor no intestino, uma vez que diminui o contato dos enterócitos à agentes carcinogênicos (BU, KWON, SUNG, 2014). A WHC pode ainda aumentar a excreção de partículas de origem endógena e exógena, como lipídeos e nitrogênio (CHAN et al, 2014; GUDIÉL-URBANO, GOÑI, 2002). Alguns estudos apontam que o aumento de nitrogênio nas fezes pode estar relacionado com uma maior massa microbiana, sendo esse

nitrogênio de fonte bacteriana, (Tungland e Meyer (2002; COSTA, MARTINO, 2008) e ainda ao aumento do turnover celular na mucosa intestinal (SEAL, MATHEUS, 2001). Assim, ao observar nossos resultados temos que o grupo AP100 apresentou maior excreção de nitrogênio fecal, enquanto que no grupo AP50 a dieta não influenciou nesse parâmetro.

Evidências apontam uma possível interpretação negativa do aumento da excreção de nitrogênio fecal em virtude da natureza da fibra dietética e proteína da dieta (ROBERFROID et al, 2010). A presença de metabólitos nitrogenados ( $\text{NH}_3$ ), resultantes da fermentação pela microbiota colônia de proteínas que não foram previamente absorvidas no intestino delgado, resultariam em acúmulo de nitrogênio no ceco e conseqüentemente maior excreção de nitrogênio fecal (TUNGLAND e MEYER, 2002). O maior acúmulo de  $\text{NH}_3$  está associado a menor saúde intestinal, visto que a presença desse composto tóxico pode alterar o turnover celular, influenciando na preservação de vilosidades e criptas intestinais (VISEK, 1984).

Vale destacar então que o maior N fecal detectado no grupo AP100 parece estar relacionado ao aumento da massa microbiana, uma vez que este foi o grupo a apresentar melhores resultados na morfometria intestinal, principalmente no que se refere aos segmentos do colón e ceco (Figura 2). Isso nos permite inferir que a alga *Gracilaria birdiae* sofre ação da microbiota intestinal por agir como substrato fermentável, e assim assumir atividade prebiótica (O'SULLIVAN et al 2010).

A proporção encontrada no intestino para os ácidos graxos voláteis acetato, propionato e butirato é de 75:15:10 a 40:40:20 respectivamente (BERGMAN, 1990). Esses três ácidos graxos representam os principais produtos resultantes da fermentação de fibras dietéticas por bactérias colônicas no intestino. A quantidade total de ácidos graxos não variou entre os grupos teste e controle, entretanto observamos uma mudança no teor de acetato dos grupos. Assim, semelhantes concentrações de ácidos graxos totais estão relacionadas ao mesmo teor de carboidratos, independente da fonte, enquanto a composição desses ácidos graxos está relacionada à qualidade da fibra da dieta (HWANG et al, 2014). Um recente estudo de Adan e colaboradores com diferentes fontes de fibras fermentáveis também encontrou maior quantidade de acetato em dietas com 5% e 10% de celulose, atribuindo esse achado a possibilidade de diferentes padrões e taxas de fermentação das fibras solúveis o que uma avaliação pontual nas amostras fecais não permitem explorar.

Em nosso estudo encontramos uma maior proporção de propionato em todos os grupos, não apresentando diferença significantes entre os mesmos ( $p > 0,05$ ). Diferente do acetato, a metabolização do propionato acontece em maior proporção no fígado (CAVAGLIERI, VECCHIA, THOMAZ, 2002). Pascoal e colaboradores (2013) apontam que o propionato é o principal ácido graxo volátil relacionado a efeitos anti-lipogênicos no organismo, sua ação está voltada à inibição de enzimas chave na síntese de lipídeos como a glicerol -3 – fosfato aciltransferase e a ácido graxo sintase (TUNGAND, MEYER, 2002). Esse mecanismo ajuda a entender e embasar a possibilidade dos grupos testes terem apresentado maior utilização desse ácido graxo em relação ao controle, uma vez que mesmo não apresentando diferença estatística na detecção do propionato nas fezes, ao avaliarmos a presença de gotículas de gordura no fígado (Figura 3) essa esteve em menor proporção nos grupos AP100 e AP50. Assim, parece que a substituição parcial das fibras da dieta por algas já pode influenciar na maior metabolização dos ácidos graxo no fígado.

Como os ácidos graxos voláteis são utilizados como fonte de energia para os colonócitos, um fator que também contribui para a interpretação que a *Gracilaria birdiae* agiu como agente prebiótico foi a detecção de aumento da mucosa e a presença de criptas mais profundas no colón e ceco dos grupos testes (Tabela 6). Esses parâmetros estão relacionados à um efeito benéfico na morfologia intestinal, permitindo inferir que apenas a substituição da fonte da fibra da dieta pela *G. birdiae* já foi suficiente para provocar os mesmos efeitos observados em estudos que testam a suplementação da dieta com fonte de fibras convencionais (ADAM et al, 2014; KNAPP et al, 2013; PATURI et al, 2012).

As análises histológicas nas 3 porções do intestino permitiram observar que houve aumento da espessura da camada muscular externa nos grupos testes. As fibras solúveis ao atingirem o intestino delgado absorvem maior quantidade de água formando um conteúdo viscoso. Assim, há um aumento do trabalho nessa camada intestinal devido ao maior exercício de contração e conseqüente aumento das fibras musculares para impulsionar esse conteúdo viscoso à diante (HWANG, 2015; JUDD, TRUSWELL, 1985).

Esses achados nos permitem pensar que o consumo da alga *G. birdiae* está relacionado ao aumento dos indicadores de saúde intestinal como aumento da mucosa, criptas intestinais mais profundas, camadas musculares mais desenvolvidas, maior volume cecal e umidade das fezes (PATURI et al, 2012).

Os parâmetros bioquímicos, em especial a atividade das enzimas hepáticas (AST e ALT), somado aos resultados histológicos do fígado revelam que a presença de *G. birdiae* na dieta não desempenhou efeito tóxico aos animais. Resultados semelhantes foram encontrados por Chan et al (2015) e Chan et al (2014) em seus estudos com a alga *Gracilaria changii*. O autor atribui os benefícios da alga principalmente às fibras da dieta e a presença de compostos fenólicos das mesmas (CHAN et al, 2014). Assim, a alga *Gracilaria birdiae* nas quantidades utilizadas no presente estudo parecem não apresentar efeito hepatotóxico, sendo possível ainda a investigação do efeito hepatoprotetor dessa alga.

## **5 CONCLUSÃO**

O consumo da alga *Gracilaria birdiae* por roedores influenciou o ganho de peso dos animais e foi substrato fermentável para a microbiota intestinal, contribuindo para efeitos benéficos no perfil de ácidos graxos no tecido adiposo e hepático. A substituição parcial da fibra da dieta por algas já foi suficiente para obter resultados positivos importantes na morfologia intestinal, indicando que o consumo dessa alga está ligada à saúde intestinal. A alga *G. birdiae* não apresentou efeito tóxico nas quantidades consumidas, assim revelou-se um ingrediente alimentar importante e viável para ser inserido como fonte de fibra alimentar. Estudos que avaliem marcadores específicos envolvidos na metabolização de produtos da fermentação da fibra da alga *G. birdiae* podem ajudar a esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos nos resultados do presente estudo.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, Clare L., et al. Different types of soluble fermentable dietary fibre decrease food intake, body weight gain and adiposity in young adult male rats. **Nutr Metab**, , p.11-36, 2014

ALMEIDA, C. L. F. et al. Bioactivities from Marine Algae of the Genus Gracilaria. *Int. J. Mol. Sci*, v.12, 4550-4573; 2012.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 18th. Ed. AOAC, Arlington, VA, 2005.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiol. Rev**, v. 70, n. 2, p.567-590, 1990.

BEZERRA, A.F.; MARINHO-SORIANO, E. Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. **Biomass Bioenergy**, v.34, p.1813–1817, 2010.

BOCANEGRA, A. et al. Characteristics and Nutritional na Cardiovascular – Health Properties of Seaweeds. **Journal of Medicinal Food**. v. 12; n.2; p. 236-258, 2009

BU, So Young; KWON, Hoonjeong; SUNG, Mi-Kyung. Supplementation of Seaweeds Extracts Suppresses Azoxymethane-induced Aberrant DNA Methylation in Colon and Liver of ICR Mice. **Journal of cancer prevention**, v.19, n. 3, p. 216, 2014.

CAVAGLIERI, C. R; VECCHIA, M. G.; THOMAZ, A. S. Ácidos Graxos Voláteis. In: CURI, R. et al. **Entendendo as gorduras: ácidos graxos voláteis**. Ed. Manole. São Paulo. v.1, p. 433-438, 2002.

CHAN, P.T. et al. Antioxidant and hypolipidaemic properties of red seaweed, *Gracilaria changii*. *J Appl Phycol*. v. 26; p 987-997; 2014.

CHAN, Pei Teng, et al. Histopathological studies on liver, kidney and heart of normal and dietary induced hyperlipidaemic rats fed with tropical red seaweed *Gracilaria changii*. **Journal of Functional Foods**, v.17, p.202-213, 2015.

COLINA-COCA, Clara, et al. Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. **Food Research International**, v. 64, p. 546-552, 2014

COSTA. N. M. B. MARTINO, H.S.D. Fibras Alimentares. In: COSTA, N. M. B; PELUZIO, M. C. G. **Nutrição e Metabolismo**. Ed. UFV, Viçosa, v. 1; p 85-119, 2008

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Rome. 223 p.

FIDELIS, G. P et al. Proteolysis, NaOH and Ultrasound-Enhanced Extraction of Anticoagulant and Antioxidant Sulfated Polysaccharides from the Edible Seaweed, *Gracilaria birdiae*. **Molecules**, v. 19, p.18511-18526, 2014,

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.226, p.497, 1957.

GUARATINI, Thais. **Antioxidantes de macroalgas marinhas: caracterização química e atividade in vitro**. 2008. Dissertação - Universidade de São Paulo.

GUDIOL-URBANO, Montserrat; GOÑI, Isabel. Effect of edible seaweeds (*Undaria pinnatifida* and *Porphyra ternera*) on the metabolic activities of intestinal microflora in rats. **Nutrition research**, v. 22, n. 3, p. 323-331, 2002.

HARTMAN, L., LAGO, B.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, London, v.22, p.475-477, 1973.

HWANG, Dahyun, et al. Cherry tomato supplementation increases the area of the intestinal mucosa and the number of muscle layers in rats. **Food Research International**, v. 64 p.298-304, 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – POF**. Rio de Janeiro, 2010.

JHA, R.; LETERME, P. Feed ingredients differing in fermentable fibre and indigestible protein content affect fermentation metabolites and faecal nitrogen excretion in growing pigs. *animal*, ed. 4, v. 6, p. 603-611, 2012.

JOINT, F. A. O., et al. Fats and fatty acids in human nutrition. Karger, 2009. Lottenberg, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, ed. 5, v. 53, p.595-607, 2009.

Judd, P. A., & Truswell, A. S. (1985). The hypocholesterolaemic effects of pectins in rats. **The British Journal of Nutrition**, v.53, n. 3, p.409–425.

KING, D. E. et al. Trends in Dietary Fiber Intake in the United States, 1999-2008. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**. v.12; n.5. p. 642-648, 2012

KRISTENSEN, Mette; JENSEN, Morten Georg. Dietary fibres in the regulation of appetite and food intake. Importance of viscosity. **Appetite**, v. 56, n.1, p. 65-70, 2011.

MAEDA, H. et al. Effects of agar (kanten) diet on obese patients with impaired glucose tolerance in type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 7; p. 40-46, 2014.

MOHAMED, S; HASHIM, S. N.; RAHMAN, H.A. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**. v.23; p. 83 – 96, 2012

PATURI, Gunaranjan, et al. Effects of Potato Fiber and Potato-Resistant Starch on Biomarkers of Colonic Health in Rats Fed Diets Containing Red Meat. **Journal of food science**, v.77, n.10, 2012, H216-H223.

Q'SULLIVAN, L. et al. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. **Mar. Drugs**, n.8, p. 2038-2064, 2010

REEVES, P.G., NIELSEN, F.H., FAHEY Jr., G.C. AIN-93 purified diets for laboratory Rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* committee on the reformulation of the AIN-76 a Rodent diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.2, p.467-472, 1993.

RIOUX V, LEMARCHAL P, LEGRAND P. Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. **J Nutr Biochem**, ed. 4 v.11, p. 198-207, 2000.

ROBERFROID, Marcel, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**, 2010, 104.S2: S1-S63.

ROS, Emilio, et al. **Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta**. Postura de la federación española de sociedades de alimentación, nutrición y dietética (FESNAD). **NUTRICION HOSPITALARIA**, 2015, 32.n02.

SEAL, C. J.; MATHERS, J. C. Comparative gastrointestinal and plasma cholesterol responses of rats fed on cholesterol-free diets supplemented with guar gum and sodium alginate. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 03, p.317-324, 2001

SILVA, R. O. et al. A Sulfated-Polysaccharide Fraction from Seaweed *Gracilaria birdiae* Prevents Naproxen-Induced Gastrointestinal Damage in Rats. **Mar. Drugs**. v. 10; p. 2618-2633, 2012

SILVA, Renan O., et al. A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Marine drugs**, 2012, 10.12: 2618-2633

SOUZA, B.W.S. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**. v.27; p.287-292, 2012.

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

SWEENEY, T., et al. Effect of purified  $\beta$ -glucans derived from *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea* and *Saccharomyces cerevisiae* on piglet performance, selected bacterial populations, volatile fatty acids and pro-inflammatory cytokines in the gastrointestinal tract of pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 07, p. 1226-1234.

TUNGLAND, B. C.; MEYER, D. Nondigestible oligo-and polysaccharides (Dietary Fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in food science and food safety*, v. 1, n. 3, p. 90-109, 2002.

WISEK, Willard J. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n.3, p. 481-498, 1984.

YASMIN A. et al. Prebiotics, gut microbiota and metabolic risks: Unveiling the relationship. *Journal of Functional Foods*. v.17; p. 189-201, 2015