



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM SISTEMAS
AGROINDUSTRIAIS

FERNANDO MAGNO BITÚ MAGALHÃES

**PROPRIEDADES DO EXTRATO AQUOSO DA
MACROALGA VERDE (*Ulva lactuca* Leach)**

Pombal – PB
2017

FERNANDO MAGNO BITÚ MAGALHÃES

**PROPRIEDADES DO EXTRATO AQUOSO DA
MACROALGA VERDE (*Ulva lactuca* Leach)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como requisito obrigatório à obtenção do grau de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tejo Cavalcanti

Pombal – PB
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

M189p Magalhães, Fernando Magno Bitú.

Propriedades do extrato aquoso da macroalga verde (*Ulva lactuca* Leach) / Fernando Magno Bitú Magalhães. – Pombal, 2022.

40 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2017.

“Orientação: Profa. Dra. Mônica Tejo Cavalcanti. Referências.

1. *Ulva lactuca* Leach. 2. Antioxidante. 3. Antimicrobiano. 4. Citotoxicidade. 5. Hepatoproteção. I. Cavalcanti, Mônica Tejo. II. Título.

CDU 582.263(043)

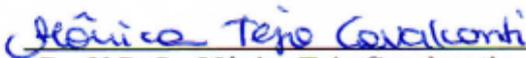
FERNANDO MAGNO BITÚ MAGALHÃES

**PROPRIEDADES DO EXTRATO AQUOSO DA
MACROALGA VERDE (*Ulva lactuca* Leach)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, como requisito obrigatório à obtenção do grau de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em: 23 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª D. Sc. Mônica Tejo Cavalcanti

Orientadora (PPGSA/UFCG)



Prof.ª D. Sc. Roberlucia Araújo Candeia

Membro Interno (PPGSA/UFCG)



Prof. D. Sc. André Leandro da Silva

Membro Interno (CSTR/UFCG)



Prof.ª D. Sc. Inês Maria Barbosa Nunes Queiroga

Membro Externo

**Dedico este trabalho ao meu Deus,
pois é ele que me sustém e sem ele nada teria e seria.
“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas.”**

Romanos 11:36^a.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, por ter sonhado primeiro esse projeto para minha vida. Implantou esse desejo no meu coração e me deu condições necessárias para lutar e alcançar cada meta em seu devido tempo.

Ao meu orientador, **Profa. D.Sc. Mônica Tejo Cavalcanti**, que em mim acreditou e confiou, propiciando orientação, incentivo, encorajamento, motivação, colaboração e compreensão, contribuindo fortemente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, **Antônio Pereira Magalhães** e **Maria Roselice Fernandes Bitú Magalhães**, minhas inspirações de batalha, dedicação, perseverança e fé. Sempre investiram e confirmaram na minha vontade e capacidade de desenvolver minhas escolhas.

Aos meus irmãos, **Cristina, Jesus Neto e Pepeu**, que estiveram ao meu lado, todo o tempo, ajudando-me a trabalhar e viver, das atividades científicas à pessoais e laborais, sempre me auxiliando.

A minha amada esposa, **Thalita Sévia**, por todo amor e dedicação comigo em todos os momentos, me encorajando e me motivando nos momentos difíceis, pois sem ela nada disso seria possível. E a minha pequena princesa **Maria Fernanda**, minha lição de vida diária e minha inspiração, que por tantas vezes entendeu a minha ausência, mas que foi determinante para que eu não desistisse no meio da caminhada.

A todos os meus colegas de laboratório por todo apoio durante a execução dos testes meu muito obrigado e que Deus os abençoe nas suas Jornadas.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin.

MAGALHÃES, F. M. B., **PROPRIEDADES DO EXTRATO AQUOSO DA MACROALGA VERDE (*Ulva lactuca* Leach)**. 40p. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Programa de Pós-graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, PB, 2017.

RESUMO

A *Ulva lactuca* Leach, popularmente conhecida como “alface do mar”, é uma macroalga marinha verde, pertencente à família *Ulvaceae*. As macroalgas são consideradas biofiltros eficientes, uma vez que absorvem e armazenam nutrientes dissolvidos no mar, melhorando a qualidade da água para a vida aquática. Há relatos da *U. lactuca* como fonte de metabólitos ativos à função antimicrobiana e hepatoprotetora, evidenciando a necessidade de investigação do seu uso. Neste aspecto, o presente estudo objetivou investigar o extrato aquoso da *Ulva lactuca* Leach, pela determinação da sua composição fenólica e atividades biológicas, tais como efeito antioxidante, citotóxico, hepatoprotetor e antimicrobiano. Para tanto, um extrato aquoso da *U. lactuca* foi preparado para os testes, dos quais: atividade antioxidante determinada pelo método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); efeito citotóxico, em teste de viabilidade de náuplios de *Artemia salina* Leach; efeito hepatoprotetor, pela dosagem de marcadores hepáticos em ratos albino da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* tratados por gavagem; e atividade antimicrobiana, contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella tiphy*, por teste de disco difusão. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato aquoso da *U. lactuca* apresenta valores razoáveis de compostos fenólicos, exibindo 25 mEq de ácido gálico/g na amostra, o que influencia na atividade antioxidante, quando exibiu efeito inibitório contra o radical DPPH de $EC_{50} = 6,82\%$, aproximadamente. Quanto ao efeito hepatoprotetor, aparentemente o uso da *U. Lactuca* não difere do uso da água destilada, uma vez que não houve diferença significativa ao avaliar testes de marcadores hepáticos (aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e bilirrubina (BL)). Quanto ao teste de susceptibilidade microbiana, o extrato aquoso não exibiu atividade contra às cepas supracitadas. Por fim, o ensaio de toxicidade exibiu valores médios de DL50 de 13.564 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente, constituindo-se uma substância atóxica. Diante do exposto, entende-se que a atividade antioxidante está intimamente relacionada à concentração de fenólicos na amostra. Neste mesmo pensamento, a ausência de atividade antimicrobiana é atribuída a ausência de metabólitos ativos responsáveis por esta ação. Portanto, sabendo que extratos vegetais exibem uma ampla atividade biológica e comumente a sua ação está relacionada à presença de determinados constituinte e a sua concentração, sugere-se ainda o desenvolvimento de testes de identificação e quantificação de composto ativos presente nessa espécie, além de testes de dose resposta e mecanismos de ação com a finalidade de dados específicos.

Palavras-chave: *Ulva lactuca* Leach. Antioxidante. Antimicrobiano. Citotoxicidade. Hepatoproteção.

ABSTRACT

Ulva lactuca Leach, popularly known as "sea lettuce", is a green seaweed belonging to the *Ulvaceae* family. Macroalgae are considered efficient biofilters, as they absorb and store nutrients dissolved in the sea, improving water quality for aquatic life. There are reports of *U. lactuca* as a source of active metabolites with antimicrobial and hepatoprotective function, therefore, highlighting the need to investigate its use. This study aimed to investigate the aqueous extract of *Ulva lactuca* Leach, by determining its phenolic composition and biological activities, such as; antioxidant, cytotoxic, hepatoprotective and antimicrobial. For that, an aqueous extract of *U. lactuca* was prepared for the following assays: antioxidant activity determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method; cytotoxic effect, viability of *Artemia salina* Leach nauplii; hepatoprotective effect, by measurement of liver biomarkers in gavage treated albino *Winstar* rats (*Rattus norvegicus*); and antimicrobial activity against bacterial strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella tify*, by disk diffusion test. The results obtained showed that the aqueous extract of *U. lactuca* presents reasonable values of phenolic compounds, exhibiting 25 mEq of gallic acid/g in the tested sample. This value influences the antioxidant activity, which exhibited an inhibitory effect against the DPPH radical of approximately $EC_{50} = 6, 82\%$. As for the hepatoprotective effect, apparently, the use of *U. lactuca* does not differ from the use of distilled water, since there was no significant difference when evaluating liver biomarkers (aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (FA) and bilirubin (BL)). As for the microbial susceptibility test, the aqueous extract did not show activity against the previously mentioned strains. Lastly, the toxicity assay showed mean LD50 values of approximately 13,564 $\mu\text{g/mL}$, constituting a non-toxic substance. Given the above, it is understood that the antioxidant activity is closely related to the concentration of phenolics in the sample. Following this line of thought, the absence of antimicrobial activity is attributed to the absence of active metabolites responsible for this action. Therefore, knowing that plant extracts exhibit wide biological activity and that usually their action is related to the presence of certain constituents and consequently concentration, it is suggested the development of studies for the identification and quantification of active compounds present in this species besides studies of dose response and mechanisms of action for the purpose of specific data.

Key-words: *Ulva lactuca* Leach. Antioxidant. Antimicrobial. Cytotoxicity. Hepatoprotection.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma dos ensaios adotadas para análise da macroalga verde *Ulva lactuca* Leach.....25
- Figura 2.** Desenho experimental para identificação de disco de difusão em ensaio antimicrobiano.....29
- Figura 3.** Ensaio da atividade antimicrobiana por disco difusão em ágar utilizando o extrato da *U. lactuca* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.....34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ASL	Aspartato minotransferase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BD	Bilirrubina direta
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina
Ca	Cálcio
CHC	Carcinoma hepatocelular
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and laboratory standards institute</i>
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DL50	Dose letal capaz de matar 50 % da população
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EA	Extrato aquoso
EP	Extrato aquoso + Paracetamol
FA	fosfatase alcalina
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
i.p.	Intraperitoneal
IA	Índice aterogênico
K	Potássio
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
Na	Sódio
NAPQI	n-acetil-p-benzoquinonaimina
NCCLS	<i>National committee for clinical laboratory standard</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Fósforo
<i>U. lactuca</i>	<i>Ulva lactuca</i> Leach
UFC	Unidade Formadora de Colônias

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES E GRANDEZAS

mg/kg	miligramas por kilograma
%	por cento
µg/mL	microgramas por mililitro
cm	Centímetro
kg/hab./ano	quilogramas por habitante por ano
km	Quilómetro
kg	Quilograma
g/kg	gramas por kilograma
°C	grau Celsius
h	Hora
µL	Microlitro
µM	microgramas por mol
mm	Milímetro
g	Gramas
µg/mL	microgramas por mililitro
mEq	Miliequivalente
p/v	peso/volume
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral	15
2.2	Específicos	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1	Aquicultura	16
3.2	<i>Ulva lactuca</i> Leach	18
3.2.1	<i>Atividade hepatoprotetora e antioxidante da <i>Ulva lactuca</i> Leach</i>	18
3.2.2	<i>Ação antimicrobiana da <i>Ulva lactuca</i> Leach</i>	19
3.3	Carcinoma Hepatocelular	20
3.4	Microrganismos de Importância Biológica	21
3.5	Constituintes Químicos Vegetais Antioxidantes	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Material	24
4.2	Métodos	24
4.2.1	<i>Obtenção do extrato aquoso da <i>Ulva lactuca</i> Leach</i>	24
4.2.2	<i>Quantificação do teor fenólico total da <i>Ulva lactuca</i> Leach e determinação da atividade antioxidante do extrato</i>	25
4.2.3	<i>Determinação dos marcadores hepáticos</i>	26
4.2.3.1	Animais e delineamento experimental	
4.2.3.2	Determinação de aspartato aminotransferase (AST)	27
4.2.3.3	Determinação de alanina aminotransferase (ALT)	27
4.2.3.4	Determinação de fosfatase alcalina (FA)	27
4.2.3.5	Determinação de bilirrubina (BT)	28
4.2.4	<i>Determinação da Atividade Antimicrobiana</i>	28
4.2.5	<i>Ensaio de viabilidade celular a partir de náuplios de <i>Artemia salina</i> Leach</i>	29
4.2.6	<i>Análise Estatística</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Atividade antioxidante do extrato aquoso da <i>U. lactuca</i> L.	34
5.2	Atividade hepatoprotetora do extrato aquoso da <i>U. lactuca</i> L.	32
5.3	Atividade antimicrobiana do extrato aquoso da <i>U. lactuca</i> L.	34
5.4	Atividade citotóxica contra <i>Artemia salina</i> Leach	34
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura registra ano a ano um crescimento expressivo, em média 3,2 % ao ano. Em 2006, a produção global (aquicultura continental e marinha) totalizou 47,3 milhões de toneladas, e em 2011, a produção de pescado atingiu a marca de 63,6 milhões de toneladas (FAO, 2016).

No entanto, essa intensificação das práticas aquícolas causam danos ao meio ambiente, devido ao alto volume de efluentes com matéria orgânica, nutrientes particulados e baixo teor de oxigênio dissolvido, que se acumulam no sistema produtivo, comprometendo a saúde dos peixes e crustáceos e propiciando o surgimento de biofiltros naturais, a citar as macroalgas. Estas depositam-se no solo, sendo capazes de melhorar a qualidade da água e, conseqüentemente, melhora na produção de pescado, além de reduzir a quantidade de oxigênio disponível para mariscos (SOARES et al., 2012).

As macroalgas são consideradas biofiltros eficientes, uma vez que absorvem, assimilam e armazenam nutrientes dissolvidos no mar provenientes da cadeia produtiva até a sua morte. A *Ulva lactuca* Leach (*U. lactuca*) é uma macroalga marinha verde, pertencente à família *Ulvaceae*, conhecida popularmente como alface do mar. Apresenta-se com talo da cor verde claro, laminar expandido com margem lisa, altura 4-6 cm e 3,5-5 cm de largura, rica em fibras com hemicelulose, celulose e lignina, minerais, proteínas com presença de grandes quantidades de aminoácidos essenciais e ácidos graxos, com predominância de ácido palmítico e ácido oleico. Ainda foi identificado a presença de compostos fenólicos e flavonóides na *U. lactuca*, por Kosanić, Ranković e Stanojkovic (2015). Estes autores relatam atividade antioxidante e antimicrobiana, ambas atribuídas à presença dos metabólitos secundários.

Hussein et al. (2015), apontam a *U. lactuca* como alternativa para o tratamento do carcinoma hepatocelular (CHC), ao demonstrar que ratos com indução de CHC e tratados com o extrato hidroalcoólico e polissacarídeo sulfatado da *U. lactuca* reduziram os valores séricos de marcadores de lesão hepática e significativa diminuição da inflamação e necrose do fígado.

Neste sentido, o número de estudos com o uso de vegetais tem crescido a cada dia afim de alternativas terapêuticas eficientes para a prevenção e tratamento de diversos tipos de doenças, como doenças inflamatórias, metabólicas e carcinogênicas (de Almeida Magalhães, et al. 2020). Como exemplo, pode-se citar o próprio CHC relatado anteriormente, câncer primário derivado das principais células hepáticas. Esta doença exhibe elevado índice de óbito após o início dos sintomas, sendo o quinto tipo de câncer mais comum em homens. Quando detectado

apenas na fase sintomática o paciente sem tratamento tem expectativa média de vida inferior a um mês.

De Almeida Magalhães et al. (2020), em extensa revisão de literatura, identificaram que produtos de origem vegetal têm sido evidenciado pela presença de importantes metabólitos capazes de proporcionar a cura ou prevenção de doenças, ou ainda melhorar a qualidade de vida da população. Isto exhibe a importância e necessidade de buscas incansáveis por constituintes de origem vegetal cuja aplicação biológica seja eficaz e segura, uma vez que alguns tratamentos atualmente realizados podem se constituir limitados e pouco eficazes (GOMES et al., 2013).

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo identificar a composição fenólica, capacidade antioxidante, ação citotóxica, efeito hepatoprotetor e atividade antimicrobiana da *Ulva lactuca*. Para tanto, um extrato aquoso da *U. lactuca* foi preparado para os testes, dos quais: a atividade antioxidante foi determinada pelo método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); o efeito citotóxico, em teste de viabilidade de náuplios de *Artemia salina* Leach; o efeito hepatoprotetor, a partir de dosagens de marcadores hepáticos em ratos albino da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus)* tratados por gavagem; e atividade antimicrobiana, contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella tiphy*, por teste de disco difusão.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar propriedades do extrato aquoso da macroalga verde *Ulva lactuca* Leach, pela determinação da sua concentração fenólica e atividades biológicas, tais como efeito antioxidante, hepatoprotetor, citotóxica e antimicrobiana.

2.2 Específicos

- Avaliar o teor fenólico total da *U. lactuca*;
- Obter o extrato aquoso da *U. lactuca*;
- Determinar a capacidade antioxidante total do extrato aquoso da *U. lactuca* e do seu extrato aquoso, pelo sequestro de radical hidroxila por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH);
- Analisar o efeito hepatoprotetor do extrato aquoso, a partir de dosagens de marcadores hepáticos em ratos albino da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*);
- Avaliar a citotoxicidade do extrato aquoso, por teste de viabilidade de náuplios de *Artemia salina* Leach;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso, por disco difusão em ágar, contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aquicultura

A aquicultura mundial vem crescendo de maneira expressiva. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, estima que o Brasil deva registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura em 2025, sendo o aumento na produção brasileira o maior registrado no país, seguido de México (54,2%) e Argentina (53,9%) durante a próxima década. Este aumento deve-se ao fato da aquicultura ser apontada como estratégica à segurança alimentar mundial, bem como ao crescimento no aumento dos investimentos realizado no setor nos últimos anos (FAO, 2016).

Em 2010 registrou-se no Brasil um consumo de 9,75 kg/hab./ano, totalizando um crescimento de 8% em relação ao ano anterior. O país possui enorme potencial para o desenvolvimento da aquicultura, uma vez que é possuidor da maior reserva de água doce do mundo (5.500.000 hectares de lâmina d'água), e a sua extensa costa oceânica (8.400 km). Contudo, o consumo nacional é limitado, fato esse provocado principalmente pelo alto preço do pescado para o consumidor (BRASIL, 2012).

De acordo com Costa (2006), vários fatores contribuem para a pouca estruturação da atividade no país, dentre eles destacam-se dificuldade na obtenção de licenças, carência de assistência técnica, manejo inadequado e grande necessidade de capital de giro. Porém, com a ideologia de políticas de pesquisa e desenvolvimento de espécies promissoras, e ainda a modernização e profissionalização do setor acredita-se que a aquicultura brasileira pode ser estimulada ao um melhor desenvolvimento.

Nesse contexto, a carcinicultura marinha é uma das atividades agroindustriais mais atrativas economicamente. Registrou-se um aumento entre 20 a 30% da sua produção nos últimos anos alavancado pela intensificação do sistema de cultivo apoiado no aperfeiçoamento de tecnologias e insumos (FREIRE, 2007).

A intensificação das práticas aquícolas contribui para a degradação ambiental, provocando mudanças de habitat e eutrofização das águas próximas aos locais de produção, devido a grandes quantidades de nutrientes na forma de resíduos, e propiciam o surgimento de biofiltros, a citar as algas (SOARES et al., 2012).

As algas marinhas ocorrem em todo o globo servindo como fonte de nutrientes para uma grande variedade de organismos aquáticos. Podem ser classificadas em microalgas, quando necessita-se do auxílio de microscópio para serem observadas, e macroalgas, visualizadas a

olho nu. (MARINHO-SORIANO et al., 2011). Diferem entre si quanto à sua fisiologia e composição, algumas possuem um maior conteúdo mineral, outras um maior teor proteico, variando quanto às altas concentrações de fibras. São excelentes fontes de vitaminas A, B1, B12, C, D e E, riboflavina, niacina, ácidos pantotênico e fólico e minerais, tais como Ca, P, Na e K, de modo que são divididas em três grandes grupos: algas pardas, algas vermelhas e algas verdes (SOARES et al., 2012).

As macroalgas são consideradas biofiltros eficientes e vantajosos, pois interagem fisiologicamente com os nutrientes dissolvidos ou particulados provenientes da cadeia produtiva (resíduos), absorvendo e armazenando-os até a morte. A produção aquícola associada ao cultivo de alga em quantidade adequada possui inúmeros benefícios para a cadeia produtiva, pois aumentam a qualidade da água, a capacidade de produção do pescado e da alga, já que esta apresenta um crescimento 40% frente ao seu cultivo em outros locais (FREIRE, 2007).

As algas verdes (Divisão *Chlorophyta*) compõe um grupo diversificado, apresentando cerca de 7.000 espécies divididas em cinco classes (*Prasinophyceae*, *Pedinophyceae*, *Ulvophyceae*, *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*). Podem ser marinhas ou dulcícolas, sendo os estudos da sua composição química escassos (FREIRE, 2007).

Há relatos da utilização de algas na alimentação humana desde o século IV, no Japão e século VI, na China. Entretanto, somente a partir de 1930 foram comercializadas as primeiras algas processadas. O Japão é um grande consumidor (1,1 kg de alga seca/ano/pessoa), devido à grande utilização na fabricação de sushi. As algas utilizadas na alimentação humana são provenientes, principalmente, de cultivo, uma vez que a sua retirada poderia ocasionar um grande impacto ambiental. A produção mundial de algas alcançou 16 milhões de toneladas de peso vivo, sendo a aquicultura responsável por 93% (ROCHA; ALVES; LEITE, 2011).

Em 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) liberou e regulamentou o uso de algas marinhas como alimento para seres humanos, podendo se desenvolver cápsulas, tabletes ou comprimidos para esse fim. Além dos benefícios nutricionais, as algas possuem uma vantagem frente aos outros produtos marinhos, os baixos compostos alergênicos. As macroalgas apresentam uma grande quantidade de compostos bioativos, como carotenoides, ácidos graxos, substâncias essas que apresentam efeitos benéficos à saúde com suas atividades antioxidantes, antitumorais, anticoagulantes (CHANDINI; GANESAN; BHASKAR, 2008).

3.2 *Ulva lactuca* Leach

A macroalga marinha, caracterizada por uma coloração verde, pertencente à família *Ulvaceae*, conhecida popularmente como alface do mar. Apresentasse com talo da cor verde claro, laminar expandido com margem lisa, altura 4-6 cm e 3,5-5 cm de largura (NUNES, 2005).

Yaich (2013), afirma que a *U. lactuca* é rica em fibras (54,0%), minerais (19,6%), proteínas (8,5%) e lípidos (7,9%). As fibras contêm hemicelulose (20,6%), celulose (9,0%) e lignina (1,7%). Ao analisar a fração proteica, verificou-se que 42% do total de aminoácidos eram aminoácidos essenciais e o perfil lipídico foi dominado pelo ácido palmítico, que representa cerca de 60,0% dos ácidos graxos totais, seguido por ácido oleico (16,0%).

Segundo Chakraborty e Paulraj (2010), uma série de compostos polifenólicos e esteroides vêm sendo isolados de algas marinhas verdes, dentre eles destacam-se os compostos terpenoides. Uma análise nos metabólitos da *U. lactuca* propuseram que o ácido 4-hidroxibenzóico é o precursor biossintético mais provável de 2,4,6-tribromofenol, substância antimicrobiana produzida pela alga, e identificaram o composto 3-O- β -glucopyranosylstigmasta-5,25-dieno que possui ação anti-inflamatória.

U. lactuca ainda é utilizada como alimento desde os primórdios da história. Recentemente, estudos vêm relatando o seu potencial como alimento funcional, por possuírem grande quantidade de fibra dietética composta de polissacarídeos, resistentes às enzimas digestivas humanas, reduzindo assim a incidência de doenças tais como a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares. Desse modo, vem ganhando espaço na indústria e na medicina para o desenvolvimento de medicamentos e nutracêutico (AWAD, 2000; KHAIRY; EL-SHEIKH, 2015).

3.2.1 Atividade hepatoprotetora e antioxidante da *Ulva lactuca* Leach

Quando se remete a atividade hepatoprotetora, Hassan et al. (2011) observou em um dos seus estudos que ratos submetidos a dietas hipercolesterolêmicas e o uso concomitante do extrato de *U. lactuca*, reduz os valores plasmáticos em 49,6, 66 e 93% de colesterol total, triglicerídeos e LDL-colesterol respectivamente, e um aumento dos valores plasmáticos de HDL-colesterol (180%) quando comparado aos ratos submetidos a mesma dieta sem o uso do extrato da alga, diminuindo em 94% o índice aterogênico (IA), valor maior do que o encontrado para a atorvastatina (92,4%), medicamento utilizado para tratar hipercolesterolemia com risco coronariano.

Hussein et al. (2015), induziram CHC em ratos e tratou-os com o extrato hidroalcoólico e polissacarídeo sulfatado da *U. lactuca*, em seguida avaliou os parâmetros bioquímicos de lesão hepática e análise histológica do tecido, verificando que tanto o extrato, quanto o polissacarídeo, reduziram os valores séricos dos marcadores bioquímicos e apenas os tratados com polissacarídeo obtiveram significativa diminuição da inflamação e necrose hepática.

A propriedade antioxidante do extrato de *U. Lactuca* deve-se à presença de compostos fenólicos (cerca de 0,4 %) e carotenóides (cerca de 4 mg/100g) (KHAIRY; EL-SHEIKH 2015), comprovado pela mediação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), fato esse corroborado pela pesquisa de Kosanić, Ranković e Stanojković (2015), no qual demonstrou que a *U. lactuca* apresenta melhor atividade antioxidante quanto à alga *Enteromorpha intestinalis*.

3.2.2 Ação antimicrobiana da *Ulva lactuca* Leach

As algas são vistas com fonte promissora de novos compostos bioativos, pois como resultado da interação ecológica entre microrganismos e microrganismos marinhos tem-se a produção de antimicrobianos e metabólitos secundários (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2010). Estes estão associados à prevenção do desenvolvimento de doenças, como exemplo cardiovasculares, neurodegenerativas, doenças autoimunes, diabetes e cancro (ALARCÓN-FLORES et al., 2013), normalmente atribuídos aos antioxidantes presentes nos gêneros alimentícios, principalmente, às vitaminas C e E, aos carotenóides, flavonóides e aos ácidos fenólicos. Os compostos fenólicos, por exemplo, apresentam atividades cardioprotetora, antienvhecimento, antioxidante, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana, através do conhecimento das suas estruturas químicas e mecanismos de ação (LIU, 2013).

Awad (2000), extraiu o lipídeo 3-O- β -glicopiranosil e testou sua ação anti-inflamatória tópica e atividade biológica, no qual se notou que doses de 1.000 e 1.500 mg reduziram em 62,25 e 72,18% o edema, respectivamente. No mesmo estudo verificou que em concentrações de 200 mg/disco apresentou uma maior capacidade de inibição contra *Streptococcus lactus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas putidu*, quando comparado à 200 mg/disco de ampicilina, e as concentrações de 100 e 200 mg/disco inibiram o crescimento de *Fusarium oxysporum* e *Saccharomyces cerevisiae*, quase equivalente a 100 mg/disco de canestin (clotrimazol), medicamento antifúngico padrão e comumente utilizado.

3.3 Carcinoma hepatocelular

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um tumor maligno primário do fígado, derivado das principais células hepáticas. Surge quando há mutação nos genes de uma célula que se multiplica desordenadamente, podendo ser causado por agentes externos, como o vírus da hepatite, ou pelo excesso de multiplicações das células, como a regeneração nas hepatites crônicas, o que aumenta o risco de surgimento de erros na duplicação dos genes (GOMES et al., 2013; HUEZO; ÁVILA, 2014).

Para tanto, é classificado como o quinto tipo de câncer mais comum em homens, o sétimo em mulheres, sendo uma das principais causas de morte em pacientes com cirrose. Nos Estados Unidos da América - EUA, nas últimas décadas, o número de pessoas com esse câncer mais do que dobrou. Em uma expectativa em longo prazo é esperado que esse número continue a aumentar devido à crescente incidência das infecções pelo vírus da hepatite C e/ou esteato-hepatites não alcoólicas. Nesse ritmo, no ano de 2.030 é esperado que nos EUA supere o câncer de mama e o do colo do reto e assuma a terceira posição quanto à morte de pessoas por câncer. O Brasil ainda possui baixa incidência, sendo que nos estados de Espírito Santo e Bahia são os que apresentam o maior número de casos, e no estado de São Paulo é o quinto tumor mais frequente no aparelho digestivo (SINGAL; EL-SERAG, 2015; GOMES et al., 2013).

O diagnóstico do CHC pode ser feito por meio de exames de imagem, com lesão típica; marcadores tumorais (exame de sangue); anátomo-patológico (biópsia); marcadores de lesão hepática (AST, ALT e FA); e marcadores de função (Bilirrubina total e frações). Quando os marcadores tumorais não estão aumentados, a realização de biópsia pode não ser possível (pela deficiência de coagulação da insuficiência hepática, ascite ou dificuldade de acesso pela localização do tumor) ou recomendável (há risco teórico, de disseminação do tumor pelo trajeto da agulha) (LAFARO; DEMIRJIAN; PAWLIK, 2015).

O CHC é muito agressivo, quando descoberto apenas após o início dos sintomas, mais comumente icterícia e/ou ascite, o mais preocupante é o prognóstico, pois o paciente sem tratamento tem expectativa de vida média inferior a um mês, com sua sobrevivência entre algumas semanas até um ano, dependendo da extensão e do envolvimento tumoral, além disso, o tratamento nessa fase é limitado e pouco eficaz afirma Gomes et al. (2013).

Com isso, é evidente a importância do diagnóstico precoce e investigação de alternativas terapêuticas eficientes ao tratamento, melhoria do prognóstico e aumento da expectativa de vida em pacientes portadores do CHC.

3.4 Microrganismos de Importância Biológica

O uso irracional de antimicrobianos tem propiciado o surgimento de bactérias multirresistentes. A indústria farmacêutica e estudos desenvolvidos em universidades não conseguem acompanhar com a descoberta de novos medicamentos. A OMS classificou recentemente os micro-organismos considerados ameaças de resistência global, a citar o *Staphylococcus aureus*, considerado de alta prioridade por ser um importante agente patológico oportunista que coloniza um terço da população humana saudável e a principal causa de infecções bacterianas no mundo desenvolvido, dando origem a uma variedade de condições que vão desde infecções benignas da pele até endocardite infecciosa fatal e pneumonia necrosante (HAABER; PENADÉS; INGMER, 2017).

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa em forma de haste, anaeróbia facultativa, membro da família de Enterobacteriaceae, presente no trato gastrointestinal humano sem comprometer a saúde do hospedeiro, no entanto em determinadas condições é capaz de expressar traços de virulência. É o principal agente causador de doenças diarreicas, infecções do trato urinário e meningite neonatal. O aumento da resistência a antibióticos contribui para a morbidade, mortalidade e custos substanciais de saúde e sociais associados à infecção (POOLMAN, 2017).

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes de infecciosos hospitalares do Brasil, sua importância clínica deve-se principalmente pela expressão de múltipla resistência a antibacterianos graças ao intercâmbio de material genético intra ou interespecie associada a uma difícil erradicação da doença, elevando os índices de morbidade e mortalidade (NEVES et al., 2011). Foi realizado um estudo epidemiológico em centros hospitalares, avaliou-se 3.728 micro-organismos isolados de pacientes hospitalizados, sendo a *P. aeruginosa* responsável por 496 (13,3%) dos casos de infecções, além disto 30,2% era resistente ao imipenem (SADER et al. 2001).

Outra infecção provocada pela *Salmonella entérica* sorotipo Typhi, desenvolve a febre tifoide. Esta é uma doença sistêmica caracterizada clinicamente por febre alta, cefaleia, diarreia e dor abdominal, estima-se que anualmente ocorra de 12 a 33 milhões de casos, ocasionando 600 mil mortes, principalmente em países da Ásia (60%) e África (35%). No Brasil, todas as regiões registram casos, contudo os maiores índices encontram-se nos estados da Bahia (n=1.765) e Amazonas (n=1.447) (ROCHA et al., 2014).

Extratos de plantas medicinais são estudados, a partir da realização de testes *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de procurar novos compostos com atividade antibacteriana. (DUBE;

MEYER; MARNEWICK, 2017) ao realizar análise química *in vitro*, com extratos de solventes orgânicos e alga verde *Chlorococcum humicola*, demonstrou a existência de compostos bioativos, como carotenóides, alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, saponinas, aminoácidos e carboidratos, tais metabólitos apresentando a capacidade de inibição do crescimento de bactérias e fungos patogênicos para o ser humano.

De acordo com Santos Filho (2006), o objetivo primário do teste é determinar a concentração inibitória mínima (CIM) as substância teste, frente a uma bactéria. Almeida (2015), afirma que a CIM se define pela menor concentração da droga em estudo capaz de inibir o crescimento *in vitro* das bactérias, sob os efeitos de ação bacteriostática, sendo o teste indicado sempre que o microrganismo causador de infecções não tenha comportamento definido em relação a antimicrobianos, portanto a concentração será determinada presuntivamente eficaz, se corresponder à mesma ocorrente em paciente com doses terapêuticas habituais.

3.5 Constituintes químicos vegetais antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que efetivamente impede ou atrasa os efeitos adversos causados por radicais livres, mesmo quando a sua quantidade de é menor do que a substância a ser oxidada. Os antioxidantes naturais são amplamente encontrados na natureza, em plantas e algas marinhas, impedindo a formação do radical e melhorando o sistema endógeno na prevenção de doenças degenerativas (OUYANG et al., 2017).

Por sua vez, compostos fenólicos compõem uma grande classe de fitoquímicos cuja atividade antioxidante é expressada. Sua fórmula química contém pelo menos um anel aromático, unidos por uma (ou mais) hidroxila(s), são classificados em dois grandes grupos, flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides são compostos por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado, e diferenciam-se em flavanóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides dependendo do grau de hidrogenação e da substituição do heterociclo. Os não flavonóides são compostos benzóicos e cinâmicos, contendo um anel aromático com ao menos um grupo hidroxila e grupos funcionais aldeídos, álcoois ou ácidos (ZAMORA; AGUILAR; HIDALGO, 2017).

Os compostos fenólicos identificados na alga *U. lactuca* foram grupos fenol; ácido 4-hidroxifenilacético, e quantidades traços de ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldeído, 2,4,6-tribromofenol, 4-hidroxifenilacético e 3,5-dibromo-4-hidroxibenzóico (FLODIN; WHITFIELD, 1999).

Ao referir a atividade antioxidante exercida pelos metabólitos, diferentes mecanismos de ação podem ser desempenhados a fim de cumprir com esta atividade, como: sequestro de radicais livres, quelação de íons metálicos, como o Fe^{2+} e o Cu^+ ou doação de átomos de hidrogênio, ambos são capazes de neutralizar a os radicais livres (TREML E ŠMEJKAL, 2016). Conseqüentemente, uma série de reações indesejáveis pode ser estagnada, como a interrupção da reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificação do potencial redox do meio, repararo de lesão molecular provocada por radicais livres; bloqueio da ação enzimática pró-inflamatória e inibição da ativação de carcinógenos (KOSANIC, RANKOVIC E STANOJKOVIC, 2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

As algas, *U. lactuca*, foram coletadas do mar, na cidade de Fortim litoral do Ceará (Latitude: -4.4526, Longitude: -37.8003) 4° 27' 9" Sul, 37° 48' 1" Oeste. O período de coleta foi compreendido entre janeiro a março de 2017. As plantas frescas foram limpas, lavadas no local com água potável, e, em seguida, secas ao sol e acondicionados em sacos plásticos. Em sua chegada ao laboratório, as amostras de algas foram conservadas congeladas até o momento dos experimentos.

4.2 Métodos

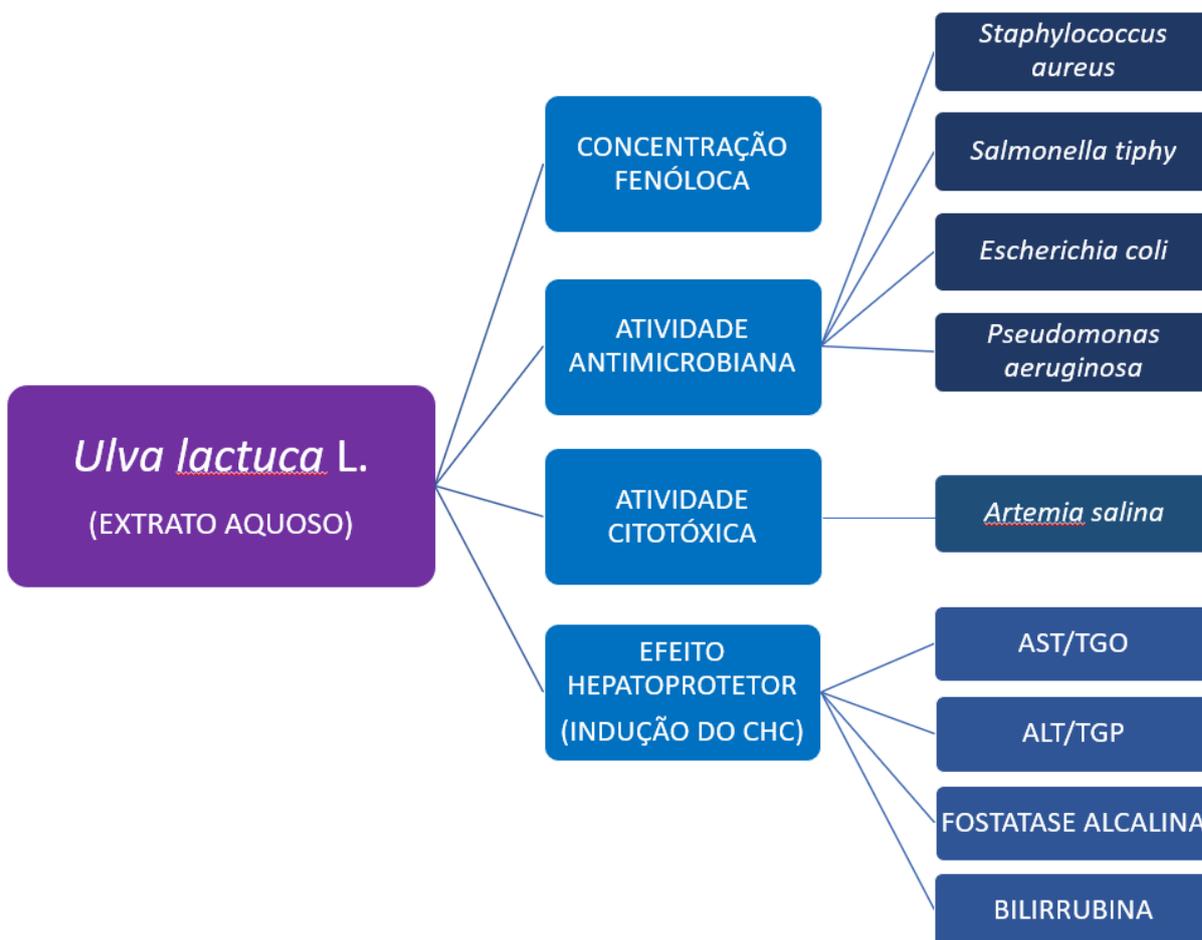
O procedimento foi dividido em quatro partes distintas: determinação de compostos fenólicos totais; identificação hepatoprotetora, em experimento com ratos, a partir da indução do CHC, administração do extrato aquoso de *U. lactuca* e determinação dos marcadores de lesão hepática, tais: alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e bilirrubina; análise da citotoxicidade *in vitro*, frente à *Artemia salina* Leach; e determinação da concentração inibitória mínima.

Para cumprir com a finalidade desse estudo, considerando diferentes metodologias adotadas para obtenção da matéria-prima e tratamentos para processamento e investigação da *U. lactuca*, foi elaborado um diagrama esquemático quanto ao que se propõe examinar, possibilitando assim, uma visualização holística de todo o processo (Figura 1).

4.2.1 Obtenção do Extrato Aquoso

As algas secas foram lavadas cinco vezes com água destilada e uma vez com álcool etílico 50% (v/v) para retirar o excesso de sal e sujeiras. Em seguida, foram triturada em liquidificador adicionada de água destilada (1:10, p/v) e acondicionadas em recipiente estéril ao abrigo da luz por 72 h. Após maceração o extrato foi filtrado e armazenado sob refrigeração até a realização das análises.

Figura 1 – Fluxograma dos ensaios adotadas para análise da macroalga verde *Ulva lactuca* Leach.



Fonte: Obtido em estudo, 2017. Legenda: AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase. CHC: Carcinome Hepatocelular.

4.2.2 Quantificação do teor fenólico total da *Ulva lactuca* Leach e determinação da atividade antioxidante do extrato

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Waterhouse (2012), utilizando o ácido gálico como padrão e leitura em espectrofotômetro a 765nm. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Fernandes et al. (2015) perante ao consumo do radical livre 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) e analisado pela monitoração da absorbância a 515nm. A curva de calibração foi realizada com soluções de DPPH a 600 μM , Trolox a 500 μM e água destilada, com concentrações finais de 17,5, 35, 70, 105, 140 e 175 mg/mL. Como controle, foi preparado uma solução com 3150 μL de DPPH e 350 μL do solvente e realizadas leituras no tempo 0 (zero) e

com 30 minutos. A atividade antioxidante foi expressa em percentual de inibição de oxidação do radical. Calculado conforme a formula abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{DPPH} - A_{Am/Trolox}) / (A_{DPPH})) * 100$$

Os resultados foram gerados em gráfico de concentração de Trolox em μM versus % de inibição e calculada em regressão linear obtendo uma equação da reta de: $y = 3,37x + 7,26$ e $R^2 = 0,99$.

4.2.3 Determinação dos marcadores hepáticos

4.2.3.1 Animais e delineamento experimental

O projeto foi aprovado ao Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade Santa Maria sob o parecer 01/2017. Utilizou-se 20 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), machos, da linhagem Wistar, não isogênicos. Os animais foram tratados na oitava semana (idade jovem) com aproximadamente 250 g. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade Santa Maria, sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram privados da alimentação apenas duas horas antes dos ensaios.

Os animais foram divididos em dois grupos sendo um denominado “tratado” (10 animais) e outro denominado “controle” (10 animais). O grupo tratado originou dois subgrupos, sendo um grupo denominado EA (n=5 animais), quando recebeu o extrato aquoso na dose de 100 mg/kg/dia, por 8 dias; O grupo “controle” foi subdividido em dois subgrupos: controle negativo (CN), (n=5 animais), que recebeu água destilada, durante 8 dias, e controle positivo (CP) (n=5 animais), que recebeu água durante 8 dias e solução de paracetamol na dose 3.000 mg/kg no oitavo dia. Ambos os tratamentos foram realizados por gavagem e os animais foram eutanasiados 72 h após a última administração.

Para a eutanásia os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg i.p.). Realizou-se a coleta sanguínea, após incisão na região torácica e acesso ao ventrículo cardíaco esquerdo. As amostras foram encaminhadas para a realização das dosagens metabólicas.

4.2.3.2 Determinação de aspartato aminotransferase (AST)

A determinação da aspartato aminotransferase foi realizado por espectrofotometria de acordo com a metodologia de Reitman e Frankel, descrito pela Labtest Diagnóstica S.A. A enzima AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, formando assim o glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato, enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD⁺. O teste consiste na identificação da redução do oxalacetato e oxidação da coenzima NADH, em absorvância de 340nm. O teste é diretamente proporcional à atividade da AST na amostra. Os resultados são expressos em U/L de aspartato aminotransferase (Labtest Diagnóstica S.A., Ref. 109; MS 10009010018; revisão: revereiro, 2014).

4.2.3.3 Determinação de alanina aminotransferase (ALT)

A determinação da alanina aminotransferase (ALT) foi realizado por espectrofotometria de acordo com a metodologia de Reitman e Frankel, descrito pela Labtest Diagnóstica S.A.. A enzima ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. O teste consiste na identificação da redução do piruvato e oxidação da coenzima NADH, em absorvância de 340nm. O teste é diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra. Os resultados são expressos em U/L alanina aminotransferase (Labtest Diagnóstica S.A., Ref. 1008; revisão: abril, 2012).

4.2.3.4 Determinação de fosfatase alcalina (FA)

A determinação da Fosfatase Alcalina foi realizado por espectrofotometria de acordo com a metodologia de Roy modificado, descrito pela Labtest Diagnóstica S.A.. A fosfatase alcalina no soro, hidrolisa a timolftaleína monofosfato liberando a tomolftaleína, exibindo cor azul em meio alcalino. A cor formada é diretamente proporcional atividade enzimática, sendo medida em absorvância de 590nm. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato. Os resultados são expressos em U/L de fosfatase alcalina (Labtest Diagnóstica S.A., Ref. 40; MS 10009010018; revisão: junho, 2009).

4.2.3.5 Determinação de bilirrubina (BT)

A determinação da bilirrubina foi realizada por espectrofotometria de acordo com a metodologia proposta por Sims-Hom, descrito pela Labtest Diagnóstica S.A.. A bilirrubina é dosada por diazotização e formação por azobilirrubina vermelha, em absorvância máxima de 525nm. A bilirrubina direta (diglicurônide) é dosada em meio aquoso, enquanto a total (direta e indireta) é dosada por ação de potente solubilizador de ação catalisadora. Os resultados são expressos em mg/dL de bilirrubina (Labtest Diagnóstica S.A., Ref. 31; MS 10009010022; revisão: março, 2014).

4.2.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana

As cepas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* INCQS-00015 (ATCC 25923), *Salmonella tiphy* (ATCC 14028), *Escherichia coli* INCQS 00219 (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), as quais foram adquiridas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. A padronização do inóculo foi ajustada a 10^8 UFC/mL⁻¹.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o teste de sensibilidade por meio do método de disco difusão. O extrato foi diluído nas seguintes proporções: 100% (1 mL de extrato), 75% (0,75 mL de extrato e 0,25 mL de água destilada, deionizada e autoclavada) 50% (0,50 mL de extrato e 0,50 mL de água destilada, deionizada e autoclavada), 25% (0,25 mL de extrato e 0,75 mL de água destilada, deionizada e autoclavada), 10% (0,1 mL de extrato e 0,9 mL de água destilada, deionizada e autoclavada) e 0% (apenas 1 mL de água destilada, deionizada e autoclavada). Para o preparo do controle positivo, homogeneizou-se uma cápsula de norfloxacino (antibiótico) na proporção de 400 mg/20 mL de água destilada, deionizada e autoclavada.

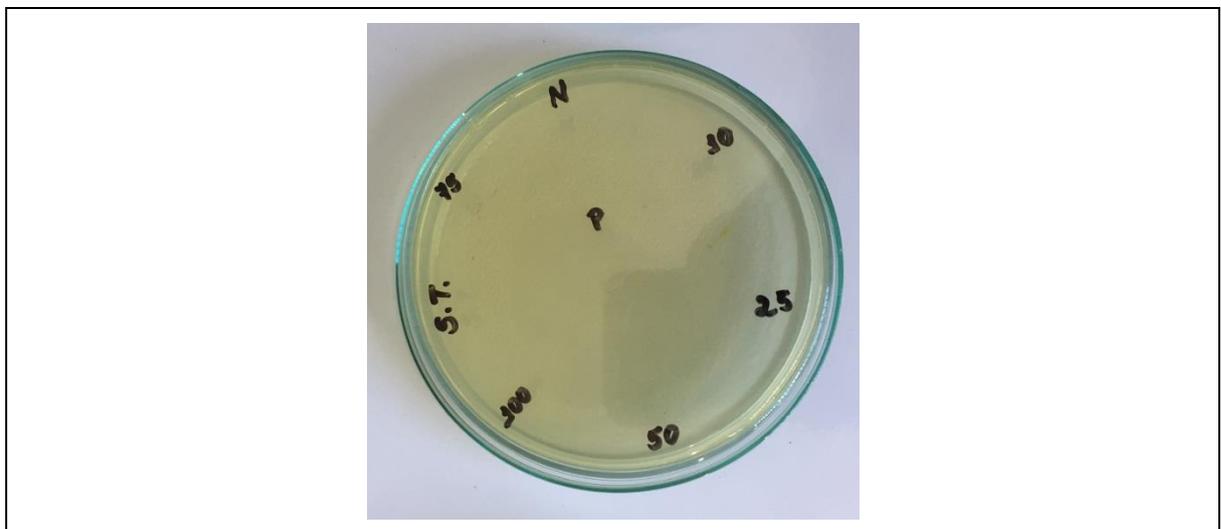
Para determinação da CIM foi adotada a metodologia proposta em *National committee for clinical laboratory standard* (NCCLS, 2011) e *Clinical and laboratory standards institute* (CLSI, 2013)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) se define pela menor concentração do antibiótico em $\mu\text{g/mL}$ que inibe o crescimento *in vitro* das bactérias, sob os efeitos de ação bacteriostática; enquanto que o halo de diâmetro (mm) constitui-se a medida milimétrica encontrada a partir da distinção do ponto onde não é possível observar o crescimento bacteriano a olho nu. Neste aspecto, considera-se a prova de sensibilidade com discos de papel em meio

de cultura sólido, conforme empregados neste estudo. De modo que, sendo conhecido o diâmetro do halo nas categorias dos perfis é possível mensurar a CIM.

Os discos foram identificados com o número das diluições (Figura 2). No disco central foi colocado o antibiótico norfloxacino (controle positivo) identificado pela letra P, os discos foram dispostos nas posições identificadas com os números 100, 75, 50, 25 e 10 seguidos de impregnação com o volume de 15 µL com auxílio de uma pipeta nas concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10 % e água destilada identificada pela letra N.

Figura 2 – Desenho experimental para identificação de disco de difusão em ensaio antimicrobiano.



Fonte: Obtida em estudo, 2017.

4.2.5 Ensaio de viabilidade celular a partir de náuplios de *Artemia salina* Leach

O bioensaio com *Artemia salina* Leach baseou-se na técnica descrita por Meyer et al. (1982), onde foi pesado 1,0 g da amostras e acrescida de 20 mL da solução salina (água do mar com água destilada (1:1)). Os ovos do microcrustáceo (0,2 g) foram incubados por um período de 24 a 48 h em gaiola com tela para impedir a entrada de insetos, com aeração e incidência direta de luz, após a eclosão, 10 náuplios serão transferidas para tubos de ensaio com diferentes concentrações de extrato (5 a 2.500 µg/mL) e contendo 5 mL de água salina em cada teste, e submetidas a iluminação artificial durante 24 horas, após esse período contabilizadas as larvas vivas e mortas, o teste será realizado em triplicata para cada concentração de extrato em estudo.

4.2.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos da avaliação hepatoprotetora, com o uso de n=5 animais por grupo, são apresentados pelos valores medianos exibidos nos testes. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de Tukey, a 95% de probabilidade, utilizando *GraphPad Prism* versão 6.00 (San Diego, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Atividade antioxidante do extrato aquoso da *U. Lactuca L.*

O extrato aquoso da *U. lactuca* apresentou valores de fenólicos totais de 25 mEq ácido gálico/g da amostra. Em estudo, Khairy e El-Sheikh (2015) observaram valores de 50 mEq floroglucinol/g. Não é possível uma comparação entre a resposta de atividade de fenólicos deste estudo e a atividade expressa por Khairy e El-Sheikh, uma vez que se trata de estudos com diferentes padrões de compostos (ácido gálico e floroglucinol), contudo o presente estudo exibe uma razoável atividade antioxidante.

Variações em concentrações de compostos fenólicos e ação antioxidante podem estar relacionadas as diferenças geográficas em que *U. Lactuca* foi coletada. Fatores climáticos, solo e água estão diretamente envolvidos na concentração de metabólitos secundários presentes nas plantas. Portanto, mesmo com o uso de testes idênticos aos anteriores realizados, resultados diferentes seriam esperados.

O DPPH é uma substância protonada amplamente utilizada para a determinação da capacidade de eliminação de radicais livres de amostras em análise. Quando a atividade anti-radical de uma substância é testada mede-se a diminuição da absorvância do radical DPPH causada pela eliminação do radical hidroxila, através da doação de hidrogênio.

O resultado obtido no estudo demonstra que o extrato aquoso de *U. lactuca* apresenta razoável efeito inibitório sobre o radical DPPH, quando $EC_{50} = 6,8172\%$. Enquanto Yaich et al. (2017) relataram valores de EC_{50} em $57,533\%$. Ao comparar estes dados, pode-se sugerir que esta atividade está relacionada às concentrações fenólicas encontradas no presente estudo.

Um estudos anterior identificou a presença de ácido 4-hidroxibenzóico como precursor biossintético para 2,4,6-tribromofenol, 3-O- β -glucopyranosylstigmasta-5,25-dieno (FLODIN; WHITFIELD, 1999). Ambas moléculas possuem estruturas que lhes conferem determinada polaridade, especialmente pela presença de substituintes hidroxilas (OH). Um ensaio de DPPH com compostos fenólicos isolados de óleo de oliva extra virgem foi realizado por Carrasco-Pancorbo et al. (2005) e evidenciou relevantes atividade antioxidante desempenhada pelas moléculas constituintes do óleo. Os autores atribuem esta atividade à presença de substituintes OH nas moléculas, bem como a sua quantidade e funcionalidade nas posições orto-di-hidroxila, sendo então capazes de formar ligações intramoleculares de hidrogênio. Esta é uma breve explicação quanto a atividade antioxidante desempenhada por compostos fenólicos.

5.2 Atividade Hepatoprotetora do extrato aquoso da *U. Lactuca L.*

As enzimas ALT e AST realizam reações de transaminação, processo intimamente ligado ao metabolismo dos aminoácidos e conseqüentemente ao fígado. Condições que ocasionam agressões e/ou lesão às células hepáticas aumentam as concentrações destas enzimas na corrente sanguínea. O aumento da concentração da enzima ALT indica lesão hepática branda, uma vez que a mesma se encontra principalmente no citosol dos hepatócitos, enquanto a elevação da atividade da AST sugere lesão hepática grave, pois esta enzima está presente em maior concentração na mitocôndria. A relação entre estas duas enzimas (AST/ALT), onde valor superior a 1,0 indica a ocorrência de lesões de maior intensidade ou a presença de doenças crônicas (BALODANO; SAUD, 2010).

A bilirrubina é o produto final da degradação do grupo prostético heme, oriundo principalmente da hemoglobina, é subdividida em duas frações, a bilirrubina indireta (BI) produzida principalmente no baço, e a bilirrubina direta (BD) resultante da conjugação da BI com o ácido glicurônico no fígado. Por depender diretamente da função hepática para converter a BI em BD, a fração indireta é utilizada em conjunto com as enzimas ALT e AST para diagnosticar doenças hepáticas, pois quanto maior for a sua concentração maior é o comprometimento hepático (STEVENSON; VREMAN; WONG, 2011).

Um dos principais modelos para induzir lesão hepática faz uso do paracetamol, por ser metabolizado principalmente pelo fígado e em altas concentrações provocar lesão hepática. Os hepatócitos possuem três mecanismos metabólicos para biotransformação do paracetamol: conjugação com ácido glicurônico (glicuronização), sulfatação e oxidação, os dois primeiros mecanismos produzem intermediários atóxicos, a oxidação, no entanto, produz n-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), metabólito altamente tóxico que em condições terapêuticas é conjugada com a glutatona e excretado na urina. Com o uso do fármaco em doses acima de 4g/dia a biotransformação por conjugação e sulfatação são exauridas e a via de oxidação aumentada, como consequência a produção de NAPQI causa hepatotoxicidade e aumento dos níveis séricos ALT, AST e BT (GUPTE, 2016).

Como esperado, o uso do paracetamol em alta dose (grupo CP) exibiu valores elevados nos testes de AST e ALT, com 723,0 e 524,67 U/L, respectivamente, exibindo diferença significativa quando comparados aos grupos tratados com o uso da água destilada (grupo CN) e extrato aquoso da *U. Lactuca* (EA) (Tabela 1). Por outro lado, valores em testes de fosfatase alcalina exibiram-se reduzidos, apesar de não diferirem significativamente do valor obtido do

grupo controle negativo. Enquanto valores de bilirrubina direta e indireta também não exibiram diferença significativa para os demais grupos (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração dos marcadores hepáticos.

Marcadores	Tratamentos			
	EA	EP	CN	CP
AST*	214,6 a	827,00 b	258,67 a	723,00 b
ALT	155,40 a	514,00 b	117,84 a	524,67 a
FA	261,60 a	192,50 a	232,00 a	283,33 a
BD	0,05 a	0,05 a	0,03 a	0,25 a
BI	0,37 a	0,67 a	0,23 a	0,52 a

Legenda: FA: fosfatase alcalina; BD: bilirrubina direta; BI: Bilirrubina indireta AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; EA: extrato aquoso da *U. Lactuca*; EP: extrato aquoso da *U. Lactuca* + paracetamol; CP: controle positivo; CN: contole negativo. *Resultados seguidos por letras diferentes nas colunas diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 95% de probabilidade.

Os resultados exibidos pelos grupos EA, os valores medianos em testes de ALT e FA, com 155,40 e 261,60 U/L, respectivamente, demonstraram-se levemente aumentados, se comparado ao grupo CN (ALT: 117,84 e FA: 232,00) (Tabela 1), contudo esses valores não exibiram diferença significativa, como demonstrado também para os demais testes. Aparentemente o uso da *U. Lactuca* na concentração usada não difere do uso da água destilada, não exercendo influencia na função hepática.

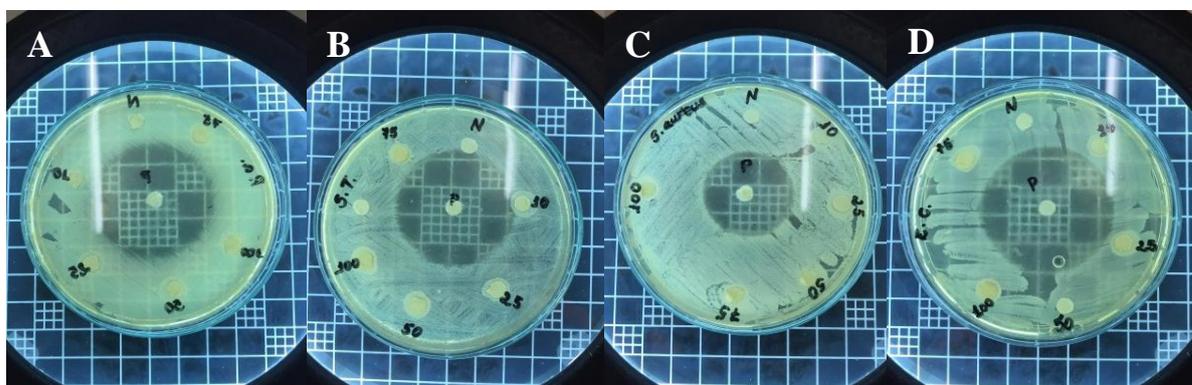
Ao avaliar o grupo EP, surpreendentemente concentrações plasmáticas das enzimas AST e ALT exibiram valores de 827,00 e 514,67 U/L, respectivamente (Tabela 1). Demonstrando uma diferença significativamente elevada quanto aos valores de AST, se comparado ao grupo CP (723,00 U/L). Esse dado sugere que o uso concomitante do extrato aquoso da *U. Lactuca* e paracetamol pode desencadear um comprometimento hepático. Contudo, neste mesmo grupo, concentrações plasmática de BD e BI demonstraram não diferir entre os demais.

Esses resultado contrapôs aos obtidos por Hussein et al. (2015), em um estudo com o extrato hidroalcoólico da *U. lactuca*, ao verificar que o extrato reduziu a concentração sérica da enzimas AST e ALT. Hipotetiza-se que a diferença entre os resultados pode estar relacionada a alguma influência de constituintes do extrato aquoso possa causar no processo do metabolismo do paracetamol, provocando um efeito negativo ainda maior às células hepáticas.

5.3 Atividade antimicrobiana do extrato aquoso da *U. Lactuca L.*

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *U. lactuca* foi verificada pelo método de disco difusão utilizando duas cepas de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* INCQS-00015 (ATCC 25923) e *Salmonella typhi* (ATCC 14028)), e duas gram-negativas (*Escherichia coli* INCQS 00219 (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)). É possível observar na Figura 3 que em nenhuma concentração do extrato apresentou atividade antimicrobiana contra essas bactérias, ao passo que não foi detectado halo de inibição para nenhuma das diluições realizadas. Foi observado o surgimento do halo de inibição somente no disco central que continha o antibiótico controle (norfloxacino). Fato este não corrobora com o estudo de Awad (2000), que atribuiu ao lipídeo 3-O-b-glicopiranosil a atividade antimicrobiana da *Ulva lactuca*.

Figura 3 – Ensaio da atividade antimicrobiana por disco difusão em ágar utilizando o extrato da *U. lactuca* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.



Fonte: Obtida em estudo, 2017. Cultura de cepas bacterianas. (A) *Pseudomonas aeruginosa*; (B) *Salmonella typhi*; (C) *Staphylococcus aureus*; (D) *Escherichia coli*.

5.4 Atividade Citotóxica contra *Artemia salina* Leach

O uso de invertebrados como bioindicadores foi implementado em testes antes do uso de vertebrados, sua aplicação ainda é marginal e envolve resultados primários, que busca avaliar a toxicidade, ser instrumento conveniente para avaliação e monitoramento de produtos naturais bioativos. O microcrustáceo *Artemia salina* L. (Artemiidae) é um invertebrado presente em ecossistemas aquáticos salinos e marinhos usado em ensaio laboratorial de toxicidade e estimativa da dose letal em plantas ou ainda extratos dessas. Outra vantagem oferecida por esse ensaio está relacionada ao não uso de animais vertebrados em testes preliminares para avaliar

o potencial toxicológico e consequentemente bioatividade, preocupação crescente da comunidade científica (HARADA, 2009).

Meyer et al. (1982), em estudos toxicológicos com extratos de plantas utilizando larvas de *A. Salina*, estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal capaz de matar 50% da população em estudo, DL50, desde então, considera-se ao verificar valores superiores a 1000 µg/mL, classificasse o extrato como atóxico. Os valores da DL50 foram de 13.564,11 µg/mL, DL50 (Limite inferior) de 2.960,11 µg/mL e LD50 (Limite superior) de 24.168,11 µg/mL demonstrando que a *U. lactuca* não apresenta toxicidade para a *A. salina*, e, consequentemente, corroborando com a pequena concentração de compostos fenólicos e baixa atividade antioxidante encontrada no estudo.

6 CONCLUSÃO

Atualmente estudos fitoquímicos são evidenciados afim de descoberta de novos compostos de origem vegetal com finalidade terapêutica, sendo a *U. lactuca* incluída neste grupo de matéria prima. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que esta *U. lactuca* apresenta valores razoáveis de compostos fenólicos, exibindo 25 mEq ácido gálico/g na amostra. Conseqüentemente, atividade antioxidante proporcional a sua composição, com efeito inibitório contra o radical DPPH de EC50 = 6,82% aproximadamente.

O extrato aquoso da *U. lactuca* não exibiu efeito hepatoprotetor ou hepatotóxico quando administrado em ratos *Wistar*, aparentemente o uso da *U. Lactuca* na concentração usada não difere do uso da água destilada. Por outro lado, quando administrado o paracetamol em adicional, sugere potencializar a lesão hepática provocada pelo fármaco. Isto pode estar relacionada a presença de algum componente químico presente da *U. Lactuca* capaz de influenciar negativamente no metabolismo hepático do paracetamol.

Quanto ao teste de susceptibilidade microbiana, o extrato aquoso não exibiu nenhuma atividade contra às cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, independente das doses testadas. Isto possivelmente está associado a ausência de metabólitos ativos responsáveis por atividades antimicrobianas. Por fim, o ensaio de toxicidade com uso de *Artemia salina* L., a *U. lactuca* exibiu valores médios de DL50 de 13.564,11 µg/mL, demonstrando não haver efeito capaz de alcançar morte em 50% da população, portando constitui-se atóxica.

Em geral, extratos vegetais exibem uma ampla atividade biológica e comumente a sua ação está relacionada à presença de determinados constituinte e a sua concentração. No estudo, observou-se uma possível relação entre a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante expressada pela *U. Lactuca*, contudo sugere-se testes de identificação e quantificação de constituintes metabólitos da espécie utilizada para o estudo, além de testes de dose resposta e mecanismos de ação afim de dados específicos.

REFERÊNCIAS

- ALARCÓN-FLORES, M. I.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G.. Multiclass determination of phytochemicals in vegetables and fruits by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p.1120-1129, nov. 2013.
- ALMEIDA, T.S.S.de. **Caracterização físico-química do fruto e susceptibilidade antimicrobiana do óleo de *Licania rigida* benth (oiticica)**. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Programa de Pós-graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande, 2015.
- AWAD, N. E. Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*. **Phytotherapy Research**, vol.14, n.8, 641–643, 2000.
- BALTODANO, J. D.; SAUD, B.. Asymptomatic Abnormal Liver Aminotransferases. **Decision Making In Medicine**, p.222-225, 2010.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Lista dos Novos Alimentos aprovados**. (2008). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm>. Acesso em: 25 agosto de 2015.
- _____. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010**. Brasília, DF, 2012.
- CARRASCO-PANCORBO, A. et al. A. Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 8918-8925, nov. 2005.
- CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R.. Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata* Delile. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p.31-41, set. 2010.
- CHANDINI, S. Kumar; GANESAN, P.; BHASKAR, N.. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 107, n. 2, p. 707-713, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.081>.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard- Eleventh Edition. Wayne, PA, USA v.32, n.1, 2012.
- COSTA, V. M. F. DA. **Utilização da macroalga *Ulva lactuca* linnaeus na redução de nutrientes (NH₄⁺, NO₃⁻ e PO₄⁻²) provenientes da carcinicultura**. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Programa de Pós-graduação em Bioecologia Aquática, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2006
- DUBE, P.; MEYER, S.; MARNEWICK, J.L. Antimicrobial and antioxidant activities of different solvent extracts from fermented and green honeybush (*Cyclopia intermedia*) plant material. **South African Journal Of Botany**, v. 110, p.184-193, maio 2017.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. Roma, 253 p. 2016.

- FERNANDES, R. P. P.; TRINDADE, M. A.; TONIN, F. G.; LIMA, C. G.; PUGINE, S. M. P.; MUNEKATA, P. E. S.; DE MELO, M. P.. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-10, 2015.
- FLODIN, C.; WHITFIELD, F. B. 4-Hydroxybenzoic acid: a likely precursor of 2,4,6-tribromophenol in *Ulva lactuca*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 2, p.249-255, maio 1999.
- FREIRE, A. R. da S. **Estudo comparativo de dois tipos de cultivo: Monocultivo (Camarões) versus cultivo integrado (Algas/Camarões)**. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Programa de Pós-graduação em Bioecologia Aquática, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.
- GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHÃO, J.G.; BOTELHO, M.F.. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**. vol.59, n.5, pp. 514-524, 2013.
- GUPTE, G. L. Management of paracetamol overdose. **Paediatrics And Child Health**, v. 26, n. 10, p.459-463, out. 2016.
- HAABER, J.; PENADÉS, J. R.; INGMER, H.. Transfer of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Trends In Microbiology**, [s.l.], p.1-13, jun. 2017.
- HARADA, T. N.. **CORRELAÇÃO ENTRE OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM ARTEMIA SALINA LEACH E ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS PARA ALGUMAS CLASSES DE PRODUTOS NATURAIS**. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.
- HASSAN, S.; EL-TWAB, S. A.; HETTA, M.; MAHMOUD, B.. Improvement of lipid profile and antioxidant of hypercholesterolemic albino rats by polysaccharides extracted from the green alga *Ulva lactuca* Linnaeus. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.333-340, out. 2011.
- HUEZO, M. S. G.; ÁVILA, J. F. S.. Mexican consensus on the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. **Revista de Gastroenterología de México (english Edition)**, v. 79, n. 4, p.250-262, out. 2014
- HUSSEIN, U. K.; MAHMOUD, H. M.; FARRAG, A. G.; BISHAYEE, A.. Chemoprevention of Diethylnitrosamine-Initiated and Phenobarbital-Promoted Hepatocarcinogenesis in Rats by Sulfated Polysaccharides and Aqueous Extract of *Ulva lactuca*. **Integrative cancer therapies**, v. 14, n. 6, pp. 525-545, 2015.
- KHAIRY, H.M.; EL-SHEIKH, M.A.. Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, v. 22, n. 5, p.623-630, set. 2015.
- KOSANIĆ, M.; RANKOVIĆ, B.; STANOJKOVIĆ, T.. Biological activities of two macroalgae from Adriatic coast of Montenegro. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, v. 22, n. 4, p.390-397, jul. 2015.

- LAFARO, K. J.; DEMIRJIAN, A. N.; PAWLIK, T. M.. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. **Surgical Oncology Clinics Of North America**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.1-17, jan. 2015.
- LIU, R. H.. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **Journal Of Food Science**, v. 78, n. 1, p.18-25, jun. 2013.
- MAGALHÃES, T. S. S. DE A.; MACEDO, P. C. DE O.; CONVERTI, A.; LIMA, ÁDLEY A. N. DE. The Use of Euterpe oleracea Mart. As a New Perspective for Disease Treatment and Prevention. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 813, 26 maio 2020.
- MARINHO-SORIANO, E.; PINTO, E.; YOKOYA, N.; COLEPICOLO, P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.. Avanços na pesquisa de bioativos de algas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p.1-2, abr. 2011.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L.. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard. M7-A6. Wayne: NIH**, 2011.
- NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N.. Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p.409-420, ago. 2011.
- NUNES, J. M. de C. **RODOFÍCEAS MARINHAS BENTÔNICAS DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL**. 410 f. Tese (Doutorado) - Curso de Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- OUYANG, H.; HOU, K.; PENG, W.; LIU, Z.; DENG, H. Antioxidant and Xanthine Oxidase Inhibitory Activities of Total Polyphenols from Onion. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, p.1-7, ago. 2017
- POOLMAN, J. T. Escherichia coli. **International Encyclopedia Of Public Health**, p.585-593, 2017
- ROCHA, D. C. da C.; MARINHO, A. N. DO R.; DOS REIS, M. DE S. O.; BORGES, I. R.; RAMOS, F. L. DE P.; LOUREIRO, E. C.B.. Perfil epidemiológico e caracterização molecular de Salmonella Typhi isoladas no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, v. 5, n. 4, p.53-62, dez. 2014.
- ROCHA, H.A.O.; ALVES, L.G.; LEITE, E.L. **Aproveitamento integral de algas marinhas** (Capítulo 4.10 – p. 454-463). In: GONÇALVES, A. A. (Ed.). Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo, SP: Atheneu, 608 p., 2011.
- SADER H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 200-14, aug. 2001.
- SANTOS FILHO, L. **Manual de microbiologia clínica**. 4 ed. João Pessoa: Editora universitária, UFPB, 2006.

SINGAL, A. G.; EL-SERAG, H. B.. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, v. 13, n. 12, p.2140-2151, nov. 2015.

SOARES, L. P.; FUJII, M. T. Novas ocorrências de macroalgas marinhas bentônicas no estado de Pernambuco, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, n.3, p.557-570, 20 jul. 2012.

STEVENSON, D. K.; VREMAN, H. J.; WONG, R. J.. Bilirubin Production and the Risk of Bilirubin Neurotoxicity. **Seminars In Perinatology**, v. 35, n. 3, p.121-126, jun. 2011.

TREML, JAKUB; LMEJKAL, KAREL. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 4, p. 720-738, 13 abr. 2016.

WATERHOUSE, A. Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, p.3-5, 2006.

YAICH, H.; AMIRA, A. B.; ABBES, F.; BOUAZIZ, M.; BESBES, S.; RICHEL, A.; BLECKER, C.; ATTIA, H.; GARNA, H.. Effect of extraction procedures on structural, thermal and antioxidant properties of ulvan from *Ulva lactuca* collected in Monastir coast. **International Journal of Biological Macromolecules**, p.1-6, jul. 2017.

YAICH, H.; GARNA, H.; BESBES, S.; PAQUOT, M.; BLECKER, C.; ATTIA, H.. Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 2, p.375-382, jun. 2013.

ZAMORA, R.; AGUILAR, I.; HIDALGO, F.J.. Epoxyalkenal-trapping ability of phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 237, p.444-452, dez. 2017.