

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**HELOISA CRISTINA DE MOURA**

**OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DE ESCAMAS DE  
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**LONDRINA**

**2020**

**HELOISA CRISTINA DE MOURA**

**OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DE ESCAMAS DE  
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello

**LONDRINA**

**2020**

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

M929o Moura, Heloisa Cristina de

Obtenção de glicosaminoglicanos de escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) / Heloisa Cristina de Moura. - Londrina, 2020.  
68 f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro.

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2020.  
Bibliografia: 57-68.

1. Glicosaminoglicanos. 2. Tilápia (Peixe). 3. Pesca - Subprodutos.  
4. Sulfato de Dermatan. I. Alfaro, Alexandre da Trindade, orient. II. Novello, Cláudio Roberto, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD:664

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Título da Dissertação N° \_\_\_\_**

**OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DE ESCAMAS DE TILÁPIA**

**(*Oreochromis niloticus*)**

**por**

**HELOISA CRISTINA DE MOURA**

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de **MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos**, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina, às 14h do dia 29 de maio de 2020. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

---

**Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro**  
Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná – Francisco Beltrão Orientador

---

**Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández**  
Universidade Federal do Rio Grande  
Membro Titular Externo

---

**Profª. Drª. Elisângela Dusman**  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná – Francisco Beltrão  
Membro titular interno

---

**Prof. Dr. Alexandre Rodrigo  
Coelho** Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná - Londrina  
Coordenador PPGTAL

A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do programa de Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos.

*Dedico esse trabalho ao meu amor, meu companheiro, que desde o início esteve presente, dando-me apoio e incentivo. Dedico também aos meus pais que são minha maior inspiração de perseverança e vida!*

## AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pelas bênçãos em minha vida;
- ✓ Agradeço a todos os professores do PPGTAL, pelos ensinamentos. Em especial ao meu orientador pela oportunidade e pela dedicação e ao meu co-orientador pela parceria e por todo o tempo que dedicou ao trabalho;
- ✓ A empresa Pescal Prata, pelo apoio;
- ✓ Agradeço à Evelyn, Helyn e Elisangela, pelo auxílio e amizade;
- ✓ As minhas queridas amigas Sandra, Vanessa, Diandra e Beatriz que sempre estiveram por perto, incentivando-me e deixando os meus dias mais alegres.
- ✓ Aos meus familiares pelas orações e pela torcida;
- ✓ A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que fosse possível a realização da pesquisa.

## RESUMO

DE MOURA, Heloisa Cristina. Obtenção de glicosaminoglicanos de escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*) 69 folhas. Dissertação de Mestrado (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2020.

Glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos aniônicos, compostos por unidades dissacarídica repetitivas de hexosamina, ácido urônico ou galactose. Suas propriedades estruturais e biológicas estão associadas à densidade de cargas negativas na molécula. Há relatos dessas estruturas estarem presentes nas mais variadas espécies, inclusive nos peixes. A produção de pescado tem alcançado números cada vez mais expressivos e o Brasil tem se destacado no cenário internacional. A espécie de maior volume de produção no país é a tilápia, e o Paraná é o estado com maior volume de produção nacional. Atrelado a esse aumento de produção e consumo, está à geração de subprodutos. As escamas representam grande parte desse material quando se considera o volume de tilápia que tem sido processado. Alternativas para o aproveitamento efetivo das escamas representam hoje, um dos maiores desafios para as plantas processadoras. O trabalho teve como objetivo, utilizar escamas de tilápia como matéria prima para a extração, isolamento e caracterização de GAGs. A extração foi realizada por hidrólise enzimática com papaína, a uma temperatura de 60 °C, durante 14 dias. Após a extração realizou-se a purificação em coluna de troca iônica. As frações obtidas com a purificação foram agrupadas de acordo com os perfis obtidos pelas análises de condutividade elétrica e pelas determinações de ácido urônico e GAGs sulfatados. De todas as frações obtidas cromatograficamente, foram agrupadas seis novas frações, destas, as que apresentaram picos majoritários nas determinações anteriormente citadas, foram caracterizadas por eletroforese em gel de agarose. Os resultados de eletroforese e ressonância magnética nuclear (RMN) indicaram a presença de GAGs sulfatados na amostra. Com base nos espectros de RMN, a fração V (F- V) apresentou maior grau de pureza, possibilitando desse modo a identificação de sinais característicos para GAGs sulfatados. Foi encontrada uma mistura de sulfato de condroitina 4 (SC4) e sulfato de condroitina 6 (SC6). Essa fração foi testada quanto ao grau de substituição (GS) por grupamentos sulfato e apresentou GS de 0,146. A F – V apresentou atividade anticoagulante, sendo a ação mais efetiva em maiores concentrações. Quando testada na presença de protamina, a F – V apresentou um efeito pró-anticoagulante. A fração apresentou efeito citotóxico/antitumoral frente às células metabolizadoras, derivadas de hepatoma de *Rattus norvegicus*, demonstrando o seu potencial de aplicação para essa finalidade. Assim, a extração de sulfato de condroitina de escamas de tilápia pode ser uma alternativa para a destinação desse subproduto, gerando benefícios econômicos, sociais e ambientais.

**Palavras-chave:** Subproduto de pescados. Escamas. Glicosaminoglicanos. Sulfato de condroitina.

## ABSTRACT

DE MOURA, Heloisa Cristina. Obtaining glycosaminoglycans from tilapia scales (*Oreochromis niloticus*), 69 leaves. Masters dissertation (Professional Master in Food Technology) – Federal University of Technology – Paraná. Londrina, 2020.

Glycosaminoglycans (GAGs) are anionic polysaccharide composed of repetitive disaccharide units of hexosamine, uronic acid or galactose. Its selected and biological properties are associated with the density of negative charges in the molecule. There are reports of these structures present in the most varied species, including fish. The production of fish has reached increasingly expressive numbers and Brazil stands out on the international scene. A species with the highest production volume in the country is tilapia, and Paraná is the state with the highest national production volume. Linked to this increase in production and consumption, it is the generation of by-products. The scales represent the part of this material when considering the volume of inclination that was processed. The alternatives for the effective use of the scales represent today, one of the biggest challenges for the processing plants. The work aimed to use tilapia scales as raw carried out by enzymatic hydrolysis with papain, at a temperature of 60 °C, for 14 days. After extraction, the ion exchange column was purified. The fractions obtained with the purification were grouped according to the profiles obtained by the electrical conductivity analyzes and by the determinations of uronic acid and sulfated GAGs. Of all fractions obtained chromatographically, six new fractions were grouped, of these those that showed major peaks in the determinations previously mentioned, were characterized by electrophoresis in agarose gel. The results of electrophoresis and nuclear magnetic resonance (NMR) indicated the presence of sulfated GAG's in the sample. Based on the NMR spectra, the V fraction (F – V) showed a higher degree of purity, thus enabling the identification of characteristic signals for sulphated GAGs. A mixture of chondroitin sulfate 4 (SC4) and chondroitin sulfate 6 (SC6) was found. This fraction was tested for the degree of substitution (GS) by sulphate groups and presented as GS of 0,146. F –V showed anticoagulant activity, being the most effective actions in higher concentrations. When tested in the presence of protamine, F- V a had a pro – anticoagulant effect. The fraction showed a cytotoxic/antitumor effect against metabolizing cells, derived from *Rattus norvegicus* hepatoma, thus demonstrating its potential for application for this purpose. The extraction of chondroitin sulfate from tilapia scales can be an alternative for the destination of this by-product, generation economic, social and environmental benefits.

Keywords: Fish by-product . Scales. Glycosaminoglycans. Chondroitin sulfate.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Unidade dissacarídica repetitiva de AH, $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ .....	23
Figura 2 - Unidade dissacarídica repetitiva de SC e SD, $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ (A). Unidade dissacarídica repetitiva de SD, $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -L-IdoA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ (B). R1 – SO <sub>3</sub> -/H, R2– SO <sub>3</sub> -/H, R3– SO <sub>3</sub> -/H.....	25
Figura 3 - Unidade dissacarídica repetitiva de Heparina e SH, $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcN-(1 $\rightarrow$ (A). $\rightarrow 4$ )- $\alpha$ -L-IdoA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcN-(1 $\rightarrow$ (B). R1 – SO <sub>3</sub> -/H, R2– SO <sub>3</sub> -/H, R3– SO <sub>3</sub> -/Ac, R4 – SO <sub>3</sub> -/H.....	26
Figura 4 - Unidade Dissacarídica repetitiva de SQ $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcN-(1 $\rightarrow$ . R1 – SO <sub>3</sub> -/H, R2– SO <sub>3</sub> -/H.....	26
Figura 5 - Fluxograma que contempla o processo de extração dos GAGs .....	31
Figura 6 - Determinação de ácido urônico, GAGs sulfatados com o reagente DMB e condutividade elétrica das amostras de escamas de tilápia.....	39
Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de agarose da amostra bruta de escamas e das frações obtidas na cromatografia de troca iônica. ....	42
Figura 8 - Estrutura do sulfato de condroitina 4 (a) e sulfato de condroitina 6 (b) .....	44
Figura 9 - Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( <sup>1</sup> H) da F-V em solvente deuterado (D <sub>2</sub> O) .....	45
Figura 10 - Espectro parcial ampliado de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( <sup>1</sup> H) da F - V em solvente deuterado (D <sub>2</sub> O) .....	45
Figura 11 - Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono ( <sup>13</sup> C) da F - V em solvente deuterado (D <sub>2</sub> O) .....	46
Figura 12 - Espectro de infravermelho (HSQC) da F - V em solvente deuterado (D <sub>2</sub> O).....	47
Figura 13 - Espectro de correlação (COSY) da F - V em solvente deuterado (D <sub>2</sub> O).....	47
Figura 14 - Atividade anticoagulante pelo ensaio do tempo de protrombina parcial ativada (aPTT) com diferentes concentrações (1,20 a 3,00 mg/mL) da F - V.....	50
Figura 15 - Absorbâncias médias de células de hepatoma de Rattus norvegicus tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F - V (µg/mL), por 24, 48 e 72 horas .....	52
Figura 16 - Absorbâncias médias de células de neuroblastoma humano tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F - V (µg/mL), por 24, 48 e 72 horas .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Frações de GAGs obtidos de escamas de tilápia separados de acordo com o gradiente de NaCl e os perfis de ácido urônico e GAGssulfados com o reagente DMB .....	40
Tabela 2- Dados de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da F - V comparados com os dados de $^{13}\text{C}$ da literatura para SC4 e SC6 (HUCKERBY et al. 2001) e padrão de SC4 .....	48
Tabela 3- Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado de rato, tratadas com a F - V, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.....	53
Tabela 4- Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de neuroblastoma humano, tratadas com a F - V, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E TERMOS

AH - Ácido hialurônico  
ANOVA - Análise de variância  
aPTT- Tempo de protrombina parcial ativada (*Activated partial thromboplastin time*)  
AT - Antitrombina  
BOD – Demanda bioquímica de oxigênio  
C - Carbono  
C - Carbono  
Ca<sup>++</sup> - Cálcio  
CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de cálcio  
CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de Cálcio  
CH<sub>3</sub>I - Iodeto de metila  
CMS – Carne mecanicamente separada  
CO<sup>-</sup> - Controle negativo  
CO<sup>+</sup> - Controle positivo  
CO<sub>2</sub>- Gás carbônico  
COSY – Espectro de correlação (*Correlation Spectroscopy*)  
CuSO<sub>4</sub> - Sulfato de cobre  
D<sub>2</sub>O - solvente deuterado  
DEAE - Dietilaminoetil  
DMB- 1-9 dimetiletileno  
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
FI – Fração I  
FII - Fração II  
FIII - Fração III  
FIV - Fração IV  
FV - Fração V  
FVI – Fração VI  
g- grama  
GAGs - Glicosaminoglicanos  
GlcA - Ácido glucurônico  
GlcN - Glucosamina  
GlcNAc - Glucosamina acetilada  
GlcNSO<sub>3</sub> - Glucosamina sulfatada  
GS - Grau de substituição  
h – hora  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico  
HCII - Cofator II de heparina  
HCl - Ácido clorídrico  
HE - Heparina  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência  
HSO<sub>3</sub>Cl - Ácido clorossulfônico  
HSQC – Espectro de infravermelho (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)  
HTC – Células derivadas de hepatoma de *Rattus norvegicus*  
Hz- Hertz  
IdoA - Ácido idurônico  
kDa - KiloDaltons  
Kg - Quilograma

Kg/hab - Quilograma/habitante  
Km - Quilometro  
L - Litro  
LiCl - Cloreto de Lítio  
M- Molar  
mA- Miliamper  
MEC- Membrana extra celular  
MHz – Mega hertz  
Min - Minuto  
mM - Milimolar  
MTT - [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide]  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Sulfato de sódio  
NaCl – Cloreto de Sódio  
nm- Nanômetro  
PDA- 1-3 diaminopropano  
PG's – Proteoglicanos  
pH- Potencial hidrogeniônico  
RMN - *Nuclear magnetic resonance*(ressonância magnética nuclear)  
RPM – Rotações por minuto  
SC - Sulfato de condroitina  
SC4 - Sulfato de condroitina 4  
SC6 – Sulfato de condroitina 6  
SCA - sulfato de condroitina A  
SCB- Sulfato de condroitina B/ Sulfato de dermatana  
SCC - Sulfato de condroitina C  
SD - Sulfato de dermatana  
SH - Sulfato de heparana  
SH-SY5Y - Derivadas de linhagem celular de neuroblastoma humano  
SNC – Sistema nervoso central  
SQ - Sulfato de queratana  
TCA – Ácido tricloroacético  
Ton - Tonelada  
UI - Unidades Internacionais  
UI/mg – Unidade internacional/miligrama  
UV-VIS- Ultravioleta visível  
V- Volts  
VC – Viabilidade celular  
µg- Micrograma  
µL- Microlitro  
µs- Microsegundo  
µM - Micromolar  
δ - Delta  
° - Grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
3.1. PRODUÇÃO DE PESCADOS .....	17
3.2. TILÁPIA .....	17
3.3. GERAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS SUBPRODUTOS DA TILÁPIA.....	18
3.4. ESCAMAS .....	20
3.5. GLICOSAMINOGLICANOS.....	21
3.5.1. Ácido Hialurônico .....	23
3.5.2. Sulfato De Condroitina E Dermatana .....	24
3.5.3. Heparina E Sulfato De Heparano .....	25
3.5.4. Sulfato De Queratana.....	26
3.6. GLICOSAMINOGLICANOS E SEUS AGENTES TERAPEUTICOS .....	27
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
4.1. MATERIAL .....	30
4.2. MÉTODOS.....	30
4.2.1. Composição Proximal Da Matéria Prima.....	30
4.2.2. Extração Dos Glicosaminoglicanos .....	30
4.2.2.1. Rendimento bruto .....	32
4.2.3. Purificação Dos Glicosaminoglicanos Por Cromatografia De Troca Iônica .....	32
4.2.3.1. Determinação do ácido urônico .....	32
4.2.3.2. Determinação de GAGs sulfatados com o reagente DMB.....	32
4.2.4. Agrupamento E Dessalinização Das Frações Obtidas Por Cromatografia De Troca Iônica.....	33
4.2.5. Caracterização.....	33
4.2.5.1. Eletroforese em gel de agarose .....	33
4.2.5.2. Ressonância magnética nuclear RMN.....	34
4.2.5.3. Determinação do grau de substituição (GS) por grupos sulfato .....	34
4.2.6. Avaliação Da Bioatividade Dos Glicosaminoglicanos.....	35
4.2.6.1. Atividade anticoagulante in vitro .....	35
4.2.6.2. Ensaio de Inibição da Atividade Anticoagulante de SC com protamina .....	35
4.2.6.3. Teste de citotoxicidade/atividade antitumoral.....	35
4.2.6.3.1. <i>Linhagens Celulares</i> .....	35
4.2.6.3.2. <i>Solução Tratamento</i> .....	36
4.2.6.3.3. <i>Ensaio de citotoxicidade/atividade antitumoral (MTT)</i> .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
5.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA MATÉRIA PRIMA .....	38
5.2. EXTRAÇÃO DOS GAGS.....	38
5.3. PURIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	39

5.4.	CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA .....	41
5.4.1.	Eletroforese Em Gel De Agarose .....	41
5.4.2.	Ressonância Magnética Nuclear – RMN .....	43
5.5.	CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO V.....	43
5.5.1.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
5.5.2.	Determinação Do Grau De Substituição Por Grupos Sulfato (GS).....	49
5.6.	AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DA FRAÇÃO V (F – V).....	49
5.6.1.	Atividade Anticoagulante In Vitro .....	49
5.6.2.	Ensaio De Inibição Da Atividade Anticoagulante Do Sulfato De Condroitina Com Protamina .....	51
5.6.3.	Teste De Citotoxicidade/Atividade Antitumoral .....	51
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta clima propício, grandes áreas disponíveis, reservatórios de água doce e uma extensa costa litorânea, portanto, a aquicultura e a pesca extrativista têm grande potencial de desenvolvimento (PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA, 2020). Atrelado a isso está o aumento do consumo de pescado, que tem apresentado uma tendência de crescimento constante, devido ao maior apelo mercadológico e de saudabilidade (FAO, 2020).

Entre as espécies criadas no Brasil, a tilápia tem ganhado destaque, apesar de não ser nativa do país. Os estados do nordeste possuem as condições de temperatura ideais para o cultivo da espécie (FAO, 2012). Porém a região sul, apresenta maior viabilidade de produção, uma vez que se encontra mais próxima dos grandes centros de comercialização, chegando a ser responsável por cerca de 41% da produção nacional (PEIXE BR, 2020). A grande aceitação da espécie pelos consumidores está relacionada à qualidade da carne, pois apresenta cor branca, textura firme, sabor agradável e delicado (FAO, 2020).

O aumento da demanda no setor tem impulsionado a criação de tilápia em cativeiro e a produção nas indústrias de processamento (PEIXE BR, 2019). Decorrente a esse aumento de produção, existe uma geração ainda maior de subprodutos oriundos do beneficiamento da matéria prima. Industrialmente, a filetagem de tilápia tem um rendimento final em torno de 32% do peso do peixe vivo, e o restante é considerado subproduto (FAO, 2020).

Para a tilápia, a cabeça, carcaça e vísceras constituem cerca de 54% do peso vivo, a pele 10%, escamas 1% e as aparas dorsais e ventrais e o corte em “v” do filé, cerca de até 5%. O volume de quaisquer subprodutos gerados, e rendimento no processamento estão diretamente relacionados com fatores como a espécie, tipo de corte, entre outros (VIDOTTI, 2011). Comparadas aos demais subprodutos do processamento industrial, as escamas representam uma menor parcela do montante total. Porém, frente a todo pescado abatido diariamente, o volume de escamas acaba se tornando de extrema significância (VIVIAN, 2013).

Algumas aplicações têm sido abordadas, como a extração de colágeno e gelatina (BORDIGNOM, 2010), uso como filtro no tratamento de efluentes (CHAGURI, 2010) e aplicação como fertilizante orgânico (LÓPEZ-MOSQUERA et al., 2011). Entretanto, há uma gama de possibilidades a serem exploradas, como a utilização desses materiais como matéria prima para a extração de compostos de interesse farmacológico.

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos lineares carregados negativamente, compostos por unidades dissacarídicas repetitivas de hexosamina (glucosamina ou galactosamina), ácido urônico (ácido glucurônico ou idurônico), ou galactose (RUDD et al., 2009; NAKANO et al., 2010). Os GAG's mais comuns são sulfato de condroitina (SC), sulfato de dermatana (SD), ácido hialurônico (AH), sulfato de queratana (SQ) heparina (HE) e sulfato de heparana (SH) (NAKANO et al., 2010).

Em virtude do montante de subprodutos gerados com o processamento do pescado há uma urgente necessidade de adoção de medidas sustentáveis pelas indústrias beneficiadoras. A obtenção de glicosaminoglicanos é visto como uma possibilidade de aproveitamento das escamas e agregação de valor ao subproduto. Considerando a grande importância da utilização de GAGs como fármacos, a busca de novas fontes para isolamento desses compostos a partir de um subproduto, possui grande relevância social, ambiental e econômica.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Extrair, isolar e caracterizar glicosaminoglicanos (GAG's), a partir de escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair GAGs mediante hidrólise enzimática;
- ✓ Purificar os GAGs;
- ✓ Caracterizar os GAGs presentes nas frações amostrais;
- ✓ Determinar o grau de substituição dos grupamentos sulfato;
- ✓ Testar a atividade anticoagulante *in vitro*;
- ✓ Avaliar a atividade anticoagulante *in vitro* em presença de protamina;
- ✓ Testar a atividade citotóxica / antitumoral.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. PRODUÇÃO DE PESCADOS

Segundo o relatório da Associação Brasileira da Piscicultura (2020), a produção brasileira de pescado cultivado atingiu 758.006 toneladas (ton) no ano de 2019. Desempenho esse representado pelo crescimento de 4,9% em relação ao ano anterior. A crescente importância da atividade justifica-se por ser uma alternativa à pesca extrativa que chegou ao seu limite máximo sustentável, pois as espécies de interesse não têm volume suficiente para intensificar a captura (SUCASAS, 2011). Portanto, com a atividade pesqueira estabilizada, um dos caminhos alternativos para o equilíbrio entre a demanda e a oferta do pescado no cenário mundial tem sido a aquicultura (FAO, 2020).

Com uma costa marítima de 8.500 km de extensão e 12% da reserva de água doce do planeta (BRASIL, 2011) clima propício, e um crescente desenvolvimento do mercado interno, o Brasil desponta como um grande produtor de pescado cultivado (PEIXE BR, 2020). Nos últimos seis anos, a produção de peixes cultivados apresentou crescimento de 31%, de 578.000 toneladas em 2014 para 758.006 toneladas em 2019 (PEIXE BR, 2020).

Em 2000, o consumo per capita foi de 6,71 Kg (ACEB, 2014), em 2019 esteve em cerca de 10 kg/hab/ano, enquanto a média mundial está na faixa dos 20 kg. Nos próximos dez anos, a procura por pescados deve aumentar tanto no mercado interno quanto no externo (PEIXE BR, 2019). Os antigos paradigmas deram lugar a novos fatores de diferenciação, consumidores mais exigentes, que valorizam produtos saudáveis (FAO, 2020), oriundos de cadeias produtivas ambientalmente corretas e economicamente viáveis (SUCASAS, 2011).

#### 3.2. TILÁPIA

A tilápia tem sido a espécie mais cultivada em diversas partes do mundo, sendo no cenário mundial a segunda espécie de maior importância, com potencial de se tornar a mais importante espécie na aquicultura mundial (THODESEN et al.; 2012) A espécie é a mais cultivada no Brasil, representando 57% da piscicultura nacional com 432.149 toneladas em 2019 (PEIXE BR, 2020).

O ano de 2019 apresentou um resultado positivo 7,96% em relação ao ano de 2018, comprovando a preferência nacional pela espécie. Com esses resultados o Brasil se consolida na 4ª posição entre os maiores produtores de tilápia do mundo. Entre os estados brasileiros, o Paraná é o grande destaque da produção nacional, com cerca de 33,8% do total. Em 2019 apresentou produção de 146.212 toneladas, seguido por São Paulo com 64.900 t, em 3º lugar Santa Catarina com 38.559 t, Minas Gerais e Pernambuco com 36.350 e 25.421 t, respectivamente (PEIXE BR, 2020). A previsão de crescimento é para que no ano de 2030, exceda 6,6 milhões de toneladas (FAO, 2020).

Sua grande utilização na piscicultura está associada à sua capacidade de adaptação às práticas de manejo alimentar, bem como possibilidade de tolerar cultivo em adensamento (FAO, 2019). Apresenta boa aceitação no mercado consumidor, destacando-se em cultivos, por apresentar crescimento rápido e rusticidade (FAO 2020).

Os estados do nordeste possuem as condições ideais para o cultivo, porém a região sul, apesar do inverno, o que diminui a taxa de crescimento dos peixes, tem a maior viabilidade de produção (PEIXE BR, 2020). Uma vez que se encontra mais próximo dos grandes centros de comercialização, o que otimiza as questões logísticas. A grande aceitação da espécie pelos consumidores está relacionada à qualidade da carne, pois apresenta cor branca, textura firme, sabor agradável e delicado (ARAÚJO, 2009).

### 3.3. GERAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS SUBPRODUTOS DA TILÁPIA

O aumento da demanda no setor tem impulsionado a criação de tilápia em cativeiro e a produção nas indústrias de processamento (BRASIL 2011). A atividade de maior destaque nas unidades processadoras é a produção de filé, com rendimento médio de produção de 32%, conseqüentemente, alta geração de subprodutos (FAO, 2019).

Subproduto do beneficiamento do pescado é toda a fração não aproveitada, com limitações tecnológicas e mercadológicas, porém que possui características químicas parecidas com o produto comercializado (SUCASAS, 2011). Para a tilápia, a cabeça, carcaça e vísceras constituem 54% do peso vivo, a pele, 10%, as escamas, 1% e as aparas dorsais e ventrais e do corte em “v” do filé, 5% (ROSA, 2009). A quantidade de resíduos e o rendimento de carcaça do pescado podem variar de acordo com a espécie, tipo de corte, tamanho da cabeça, peso do peixe, sistema de criação, entres outros (BRASIL, 2011).

Existe uma gama muito ampla de possibilidades de aproveitamento desses subprodutos, porém ainda pouco exploradas. O aproveitamento desses com o intuito de desenvolvimento sustentável, gerenciamento de recursos ambientais e redução nos custos de produção, por si só justificariam a importância potencial dessa etapa do processamento. Além de beneficiar todos esses segmentos, o fator nutricional, associado a esse resíduo, possibilita o desenvolvimento de produtos com potencial de aplicação em diversas áreas, inclusive na alimentação humana (FELTES, 2010).

As carcaças e cabeças podem ser utilizadas para a produção de caldos ou sopas (GODOY, et al., 2010). As cabeças juntamente com a pele podem ser usadas na produção de gelatina, mediante a extração do colágeno (SILVA et al., 2011; YAJIMA; FRANCO; BORDIGNON, 2011). Rosa (2009) utilizou ossos e carcaças para isolar carne mecanicamente separada (CMS) e produzir quibes e hambúrgueres, o couro, submetendo-o ao curtimento e também aproveitou cabeça, carcaça e vísceras para produção de silagem e compostagem.

Há a possibilidade de utilização dos subprodutos como fertilizante de sistemas agrícolas (LÓPEZ-MOSQUERA et al., 2011), na produção de silagem (VIDOTTI, 2011; OLIVEIRA et al., 2014), na obtenção de hidrolisados como meios alternativos para a nutrição animal (DIETERICH, 2014), ou ainda, optar em fazer o curtimento de peles para a confecção de calçados e/ou artefatos de couro (MALUF; HILBIG, 2010; FRANCO, 2011).

Inúmeros métodos de aproveitamento dos subprodutos já são de conhecimento, no entanto, os mais utilizados ainda são a elaboração de farinha de peixe (NUNES, 2011; VIDOTTI; GONÇALVES; MARTINS, 2011; HU et al., 2013) e obtenção de óleo (PRENTICE-HERMÁNDEZ, 2011; VIDOTTI; GONÇALVES; MARTINS, 2011; GONÇALVES; FERROLDI; VIEGAS, 2012), ambos destinados a produção de ração animal (BOSCOLO, et al., 2010).

Frente as exportações brasileiras que são representadas grandemente pelo filé de tilápia, parte do total desses números estão relacionados à subprodutos, tais como escamas, gorduras e farinhas. Em volume representam 65%, porém respondem apenas por 34% do

valor, o que enfatiza o baixo valor agregado desses materiais (PEIXE BR, 2020). Há uma grande necessidade de alternativas para o aproveitamento dos subprodutos, que seja economicamente viáveis, ecologicamente corretas e principalmente, que possam agregar valor a cadeia de pescados.

### 3.4. ESCAMAS

As escamas são elementos esqueléticos que recobrem e protegem os peixes (CÔRTEZ, 2014), compostas por fibras de colágeno e hidroxiapatita, que em conjunto formam uma estrutura tridimensional ordenada (PATI, ADHIKARI, DHARA, 2010). São divididas em duas camadas, a externa é composta por fibras de colágeno com diâmetro de 20-30 nm, já a camada interna é composta por fibras de colágeno Tipo I com diâmetro de 20-30 nm (OKUDA et al., 2009).

São consideradas como um compósito natural, com potencial para aplicação em diversas áreas. Seus principais componentes, colágeno e hidroxiapatita possuem alto valor comercial e potencial utilização nas áreas biomédica (SEKAR et al., 2012), alimentícia (HASIHM et al., 2015) e ambiental (LYCZKOA, NZIHOUA, SHARROKA, 2014). Comparadas aos demais subprodutos do processamento industrial, as escamas representam uma parcela pequena de todo o montante. Porém, frente a todo pescado que é abatido diariamente, o volume de escamas acaba se tornando de extrema importância (VIVIAN, 2013).

Nas indústrias de processamento, as escamas são removidas do pescado, após a insensibilização e sangria, na etapa de descamação, que pode ser manual ou automatizada. Os peixes são dispostos no equipamento (quando automatizado), e ocorre a retirada total das escamas, direcionadas por canaletas de inox até um coletor. Conforme dados observados a porcentagem de escamas pode variar de 1% (ROSA, 2009) a 3,4% (VIVIAN, 2013).

A aplicação das escamas está basicamente relacionada à extração de colágeno e gelatina (BORDIGNOM, 2010; KUMAR et al., 2011); uso como filtro devido as suas propriedades adsorptivas, podendo ser uma alternativa para o tratamento de efluentes (CHAGURI, 2010; VIDOTTI et al., 2011); aplicação como fertilizante orgânico (LÓPEZ-

MOSQUERA et al., 2011); ornamentação e artesanato; aplicação para produção de farinha de peixe e produção de silagem de peixe (ROSA, 2009).

Mesmo que a grande maioria das escamas seja destinada à produção de farinha, são necessários estudos que viabilizem a exploração de novas potencialidades associadas a esse material, a fim de fortalecer o segmento (LÓPEZ-MOSQUERA et al., 2011). Feltes et al. (2010) relataram a existência de diversas alternativas para o aproveitamento sustentável dos subprodutos gerados na indústria de pescados, com o propósito de valorizar e incrementar as possibilidades inerentes a cadeia produtiva.

### 3.5. GLICOSAMINOGLICANOS

Os glicosaminoglicanos (GAGs) pertencem a uma família de polissacarídeos aniônicos, formados por cadeias não ramificada, compostas por unidades dissacarídicas repetitivas de hexosamina (glucosamina ou galactosamina), ácido urônico (ácido glucurônico ou idurônico), ou galactose (RUDD et al., 2009; NAKANO et al., 2010). As diferentes densidades de cargas negativas faz com que os GAGs tenham propriedades estruturais e biológicas distintas (TINGBO et al., 2012). Os GAGs mais comuns são sulfato de condroitina (SC), sulfato de dermatana (SD), ácido hialurônico (AH), sulfato de queratana (SQ) heparina (HE) e sulfato de heparana (SH) (NAKANO et al., 2010), (quadro 1).

Os GAGs ocorrem nos tecidos como proteoglicanos (PGs), exceto o AH. Os PGs são macromoléculas que podem estar na superfície celular ou na matriz extracelular, onde uma ou mais cadeias de GAGs podem se ligar covalentemente. Os GAGs sulfatados estão presentes em todas as espécies que apresentam organização tecidual no reino animal, já nos reinos Plantae, Fungi e Protista os GAGs sulfatados são ausentes (SAMPAIO; NADER, 2006).

Existe uma grande diversidade de compostos que podem ser isolados principalmente no ambiente marinho, porém há certa dificuldade em obtê-los. Há estudos que tem buscado isolar esses compostos em diversas estruturas, bem como nos subprodutos gerados no processamento industrial.

GLICOSAMINOGLICANOS	P.M. <sup>1</sup>	Monossacarídeos <sup>2</sup>	Posição do Sulfato	Ligação Glicosídica
Condroitim 4-sulfato	2-5 x 10 <sup>4</sup>	β-D-N-acetilgalactosamina ácido β-D-glucurônico	4 -	β(1-3) β(1-4)
Dermatam sulfato	2-5 x 10 <sup>4</sup>	β-D-N-acetilgalactosamina ácido β-D-glucurônico ácido α-L-idurônico	4 - -	β(1-3) β(1-4) α(1-4)
Condroitim 6-sulfato	2-7 x 10 <sup>4</sup>	β-D-N-acetilgalactosamina ácido β-D-glucurônico	6 -	β(1-3) β(1-4)
Ácido hialurônico	5-50 x 10 <sup>5</sup>	β-D-N-acetilglucosamina ácido β-D-glucurônico	- -	β(1-3) β(1-4)
Queratam sulfato	1-3 x 10 <sup>4</sup>	β-D-N-acetilglucosamina β-D-galactose	6 -/6	β(1-3) β(1-4)
Heparam sulfato	1-6 x 10 <sup>4</sup>	α-D-glucosamina α-D-N-acetilglucosamina ácido β-D-glucurônico ácido α-L-idurônico	2/6 -/6 - -/2	α(1-4) α(1-4) β(1-4) α(1-4)
Heparina	0,5-5x 10 <sup>4</sup>	α-D-glucosamina ácido β-D-glucurônico ácido α-L-idurônico	2/6 - -/2	α(1-4) β(1-4) α(1-4)

**Quadro 1: Características estruturais dos glicosaminoglicanos**

1. Peso molecular médio varia neste intervalo de acordo com a origem dos glicosaminoglicanos.
  2. Todos os açúcares estão na configuração D, exceto o ácido idurônico que apresenta a configuração L.
- Fonte: Sampaio e Nader (2006)

Osborne et al. (2016), utilizaram couro bovino como fonte de glicosaminoglicanos, e obtiveram SD. Este apresentou atividade antitrombótica equivalente ao SD comercial, proveniente de mucosa suína. Flengsrud et al. (2010) em estudo com intestino e guelras de salmão (*Salmo salar*), obtiveram heparina parcialmente purificada, com potencial atividade anticoagulante tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O estudo partiu do processo de hidrólise enzimática com papaína, seguida de purificação em coluna de troca aniônica, seguido pela caracterização por RMN e cromatografia de exclusão de tamanho de partícula.

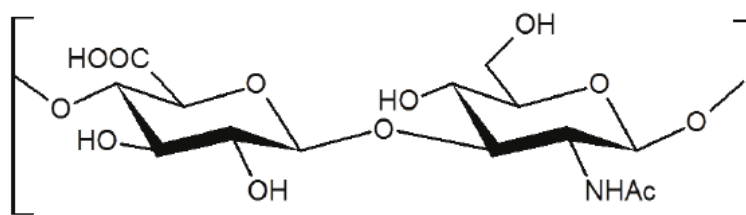
Arima et al. (2013) estudaram a diferença na composição de SC, SD e AH em diferentes tecidos e algumas espécies de peixes como, escamas de tilápia do Nilo, cabeça de cavala do Atlântico, estômago, intestino e átrio de atum do Pacífico. A extração foi conduzida por um processo de hidrólise enzimática, utilizando a protease N Amano G. a separação foi feita em coluna de troca aniônica, que foi eluída com soluções de Cloreto de Lítio (LiCl) nas

concentrações de 0,15, 0,5, 1,0, e 2,0 M. posteriormente as frações separadas foram degradadas enzimaticamente para análise quantitativa dos dissacarídeos por HPLC. A partir destes resultados foi verificado que dependendo do tecido e da espécie da qual o GAG é extraído, existem variações quanto à quantidade e grau de sulfatação do GAG.

Nogueira (2019) extraiu mediante hidrólise enzimática com Alcalase e identificou diferentes GAGs das vísceras de tilápia do Nilo e pacu, utilizando as técnicas de RMN e eletroforese em gel. As frações obtidas em ambas às amostras mostraram um perfil semelhante quanto aos GAGs, com base nas análises de eletroforese e RMN. Todas as frações isoladas apresentaram atividade anticoagulante.

### 3.5.1. Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico é um copolímero de N-acetilglicosamina e ácido glucurônico (figura 1), porém, diferente dos demais GAGs, não está ligado covalentemente a proteína e não apresenta grupamentos sulfatados. É um polissacarídeo polianiónico e quando em solução aquosa neutra, ocorrem pontes de hidrogênio entre os grupamentos carboxila e N-acetil, apresentando alta capacidade de absorção de água (CHON; BLANK, 1998).



**Figura 1- Unidade dissacarídica repetitiva de AH,  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$**

Fonte: Nogueira et al., (2019).

Devido às características da molécula, a solução de AH apresenta alta viscoelasticidade, consistência gelatinosa e elevado grau de hidratação. Pode ser encontrado em vários tecidos conectivos no reino animal, na pele e nas cartilagens, desempenhando um importante papel na flexibilidade e na manutenção dos tecidos. Além disso, atua como lubrificante no fluido das articulações proporcionando proteção para as células (KIM et al., 1996).

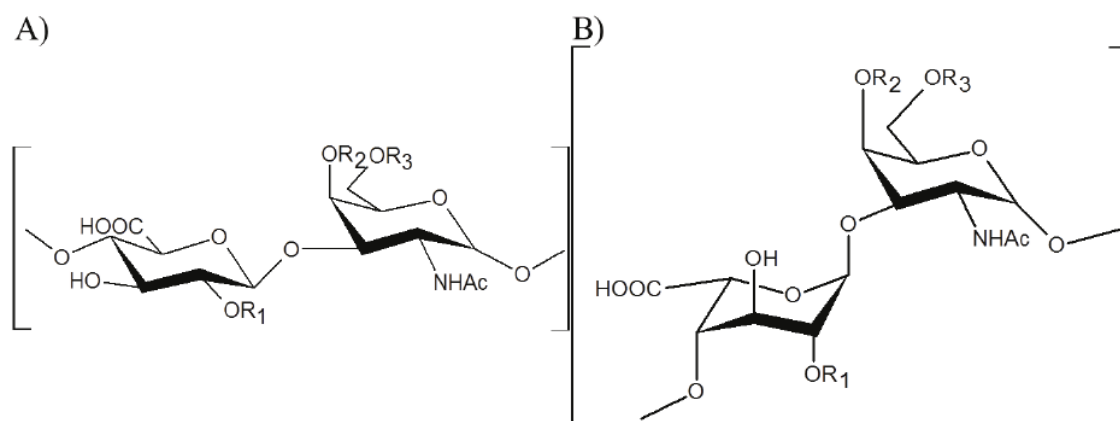


### 3.5.2. Sulfato De Condroitina E Dermatana

Amplamente encontrado em superfícies celulares e na matriz extracelular na forma de proteoglicanos (PG). De acordo com a sulfatação dos dissacarídeos, diferentes tipos de SC são conhecidos, onde os principais são: sulfato de condroitina 4 (SC4), ou sulfato de condroitina A (SCA), rico em dissacarídeos sulfatados na posição 4 da N-acetil-galactosamina (~65% Di4S) e sulfato de condroitina 6 (SC6), ou sulfato de condroitina C (SCC), que possui essencialmente N-acetil-galactosamina sulfatada na posição 6 (~90% Di6S) (figura 2 – A). O sulfato de dermatana, conhecido como sulfato de condroitina B (SCB ou SC5), possui uma estrutura híbrida devido à modificação do resíduo de ácido glucurônico, envolvendo epimerização do C-5 para formar ácido idurônico (LAMARI e KARAMANOS, 2006; VOLPI, 2007). Sulfato de condroitina é o GAG mais abundante nas articulações atua na lubrificação das juntas e também participa da ativação da enzimas extracelulares. O SC é amplamente utilizado na medicina no tratamento de osteoartrite, melhorando a mobilidade e aliviando as dores (NOGUEIRA et al, 2019).

O sulfato de dermatana é composto por resíduos de ácido  $\alpha$ -L-idurônico ou ácido  $\beta$ -D-glucurônico, ligados á galactosamina, constituindo unidades dissacarídicas de ácido urônico. Podendo apresentar O-sulfatação em C-4 e C-6 da galactosamina e em C-2 do ácido idurônico (figura 2 – B), sendo assim mais sulfatado que o condroitim sulfato, sua massa molecular pode variar de 11 a 25 kDa (MAIMONE e TOLLEFSEN, 1990).

O SD inibe a trombina associada aos coágulos, age de maneira sistêmica sem efeitos colaterais, inibindo seletivamente a ação da trombina através do cofator II da heprina. Além disso, há relatos de que possui efeito pró-fibrinolítico (LAURICELLA et al., 2013). Já foram identificados SD com propriedades antitrombóticas em uma ampla variedade de tecidos bovinos (OSBORNE et al., 2015), e em estruturas marinhas (VOLPI e MACARRI, 2009).



**Figura 2 - Unidade dissacarídica repetitiva de SC e SD,  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$  (A). Unidade dissacarídica repetitiva de SD,  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-IdoA-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$  (B). R1 - SO<sub>3</sub>-H, R2- SO<sub>3</sub>-H, R3- SO<sub>3</sub>-H**

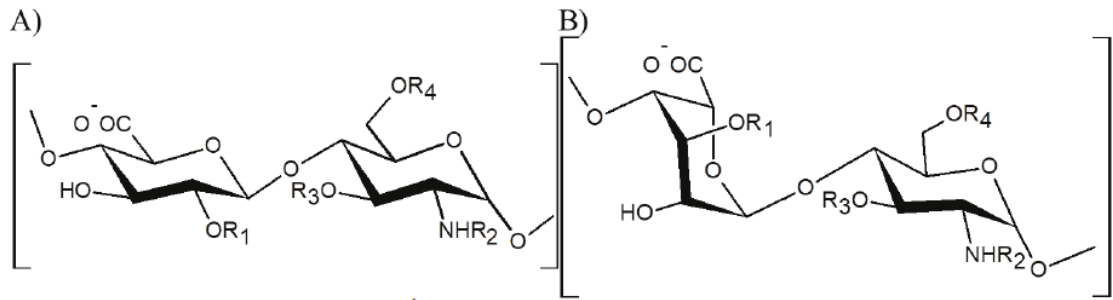
Fonte: Nogueira et al., (2019).

### 3.5.3. Heparina E Sulfato De Heparano

A heparina (HE) é composta basicamente por ácido urônico, o qual consiste basicamente de 90% de ácido idurônico e 10% de ácido glucurônico. Apresenta de 2 a 7 grupos sulfatados por unidade dissacarídica, sendo altamente substituída com resíduos de N-sulfato na posição C-2 e O-sulfato na posição C-6 (figura 3 - A). Sua massa molecular varia de 5 a 40 kDa, girando em média de 18 kDa (TORRI e GUERRINI, 2008).

O sulfato de heparano (SH) possui características únicas, apesar de ser muito semelhante à heparina, é um heteropolímero linear, composto predominantemente por ácido glucurônico, podendo ainda apresentar níveis importantes de ácido idurônico. Normalmente o SH apresenta pelo menos um grupamento sulfato por unidade dissacarídica, podendo ocorrer na forma de O-sufato na posição C-2 do ácido idurônico, ou na forma de N-sulfato na posição C-2 e O-sulfato na posição C-6 dos resíduos de glucosamina (figura 3 – B). Sua massa molecular pode variar de 5 a 50 kDa, com peso médio de 29 kDa (HILEMAN et al., 1998).

A heparina é encontrada em tecidos de vertebrados e invertebrados, principalmente nas mucosas de intestinos e pulmões. Diferentemente da heparina, o sulfato de heparano se encontra na face externa da membrana plasmática e na membrana extracelular (MEC), é produzido por todos os tecidos na forma de diferentes tipos de proteoglicanos (CARLSSON e KJELLÉN, 2012).



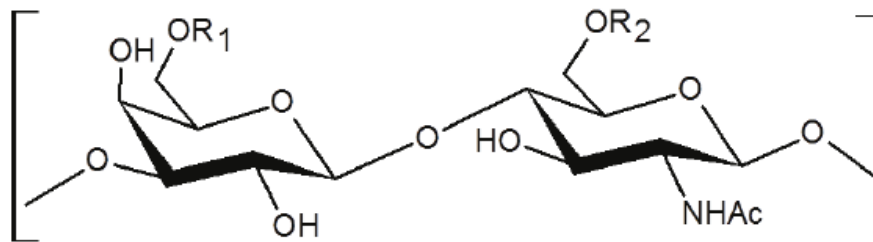
**Figura 3 - Unidade dissacarídica repetitiva de Heparina e SH,  $\rightarrow 4$ - $\beta$ -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcN-(1 $\rightarrow$  (A).  $\rightarrow 4$ - $\alpha$ -L-IdoA-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GlcN-(1 $\rightarrow$  (B). R1 – SO<sub>3</sub>-H, R2– SO<sub>3</sub>-H, R3– SO<sub>3</sub>-Ac, R4 – SO<sub>3</sub>-H**

Fonte: Nogueira et al., (2019).

#### 3.5.4. Sulfato de Queratana

Constituído por unidades repetitivas de galactose e acetilglucosamina que geralmente são O-sulfatadas em C-6 de um ou ambos os monossacarídeos constituintes (figura 4). Podendo sua massa molecular variar de 6 kDa a mais de 50 kDa dependendo do tecido e de onde for extraído (POMIN, 2015).

O sulfato de queratana (SQ) está altamente presente na matriz extracelular das córneas, ossos e do cérebro. A cartilagem é o principal tecido que contém, sua presença na urina, soro ou líquido sinovial pode ser usada como um indicador de doenças degenerativas (VOLPI, 2006). O tamanho da molécula e o grau de sulfatação variam de acordo com a idade, tipo de célula e órgão (ROTH, et al., 2008).



**Figura 4 - Unidade Dissacarídica repetitiva de SQ  $\rightarrow 3$ - $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcN-(1 $\rightarrow$ . R1 – SO<sub>3</sub>-H, R2– SO<sub>3</sub>-H**

Fonte: Nogueira et al., (2019).

### 3.6. GLICOSAMINOGLICANOS E SEUS AGENTES TERAPEUTICOS

Os GAGs estão envolvidos em inúmeras funções, como a comunicação celular, diferenciação, crescimento e ainda alguns potenciais terapêuticos como é o caso da heparina, que tem sido usada como anticoagulante há décadas (GULATI e POLURI, 2016). A bioatividade e propriedades terapêuticas dos GAGs dependem de sua capacidade de se ligar as proteínas, que são em grande parte influenciadas pelo grau de sulfatação (SOARES DA COSTA et al., 2017).

O uso potencial dos GAGs na medicina regenerativa é basicamente pelo envolvimento do SC e SD nos mecanismos de reparo do sistema nervoso central, desenvolvimento hepático e reparo no tecido conjuntivo (PLACE et al., 2009). O padrão de sulfatação e as sequências específicas dentro das cadeias desses compostos são fundamentais para a interação com proteínas bioativas relacionadas à proliferação de células tronco neurais e hepáticas (SHUHEI e KAZUYUKI, 2008).

A utilização de GAGs na regeneração de cartilagem é outro viés de aplicação, (MUZZARELLI et al., 2012), o sulfato de condroitina usado na engenharia de tecidos é comumente derivado de traquéia bovina, embora também seja utilizado SC da cartilagem de tubarão. Ambos diferem principalmente na composição do dissacarídeo, pois o SC bovino é rico em unidades (4-sulfatado) e o SC de cartilagem de tubarão em unidades C (6-sulfatadas) (UNGER et al., 2010).

No sistema nervoso central (SNC), os proteoglicanos contendo SC e SD interagem com fatores de crescimento e fatores neurotróficos (SUGAHARA e MIKAMI, 2007), podendo múltiplas sequências de SC ligarem-se a proteína funcional (PURUSHOTHAMAN et al., 2012). Organismos marinhos são uma fonte de SC e SD supersulfatados e foram abordados em trabalhos nos quais se extraiu cadeias de SC e SD de tubarão, ascídia, ouriço do mar, lula e polvo (HIGASHI et al., 2015). Alguns desses GAGs apresentam as mesmas sequências dos mamíferos. Há ainda fatores de regeneração de neurônios com o uso de células tronco (XU et al., 2011). As células-tronco transplantadas são colocadas na presença de SC para reproduzir melhor o ambiente do SNC em desenvolvimento. Existe um amplo e promissor espectro de aplicação quando o SC é usado no sentido de regeneração (SERRANO et al., 2014).

A heparina tem sido usada a cerca de 30 anos como uma droga anticoagulante, porém a crescente demanda e a preocupação com a segurança tem alavancado o interesse por novas fontes desse material. Os animais aquáticos podem ser uma alternativa, já que a heparina está presente em invertebrados como equinodermos, ascídias, crustáceos e moluscos. A heparina extraída da mucosa suína, apresenta um rendimento de 0,14 mg / g (PHARMA, 2012) e atividade anticoagulante de 180 unidades USP / mg.

A coagulação é um mecanismo de defesa do organismo que atua na prevenção de hemorragias e complicações hemorrágicas, envolve uma série de etapas que culminam na formação de um coágulo. Existem inúmeras estratégias utilizadas na prevenção desses problemas, o que vem sendo amplamente utilizado é a trombina inibidora (DAHLBACK, 2000). A heparina é utilizada como um anticoagulante e antitrombótico, bloqueando a formação de tromboplastina, um fator de coagulação do sangue. Apesar do amplo espectro de utilização, ainda há possibilidades de gerar problemas de saúde para humanos e animais, há um grande interesse pelo desenvolvimento de anticoagulantes de fontes naturais com elevado nível de segurança. Há estudos que indicam que GAGs sulfatados poderiam ser utilizados como anticoagulantes (MOU et al., 2017) e antitrombóticos (GUI et al., 2015).

A heparina comercial tem sido isolada de fontes consideradas como subprodutos industriais, tais como mucosa intestinal suína e intestino e pulmão bovino. Caráter este extremamente vantajoso do ponto de vista econômico e ambiental, viabilizando assim os sistemas de produção e consumo. Já se tem isolado a HE de cabeça de camarão, esta, porém com baixo rendimento, e baixo peso molecular (BRITO et al., 2014). Também são encontrados em ascídias (GANDRA et al., 2000), caranguejos (ANDRADE et al., 2013) e ouriços do mar (MEDEIROS et al., 2000). Apesar de algumas fontes apresentarem baixa atividade anticoagulante, algumas delas demonstram também atividade antitrombótica (SANTOS et al., 2007). O sulfato de heparana, sulfato de dermatana e sulfato de condroitina também apresentam atividade anticoagulante, porém mais baixa que a heparina (GOMES et al., 2010; KRYLOV et al., 2011).

A atividade antiviral é outra possibilidade de aplicação dos GAGs, está relacionada com a interação do sulfato de condroitina-E com proteínas de ligação do envelope viral inibindo assim a entrada na célula hospedeira (KATO et al., 2010). Há ainda a possibilidade de GAGs atuarem como inibidores da progressão de células cancerígenas, mais especificamente SH, SC e SD, livres ou na forma de proteoglicanos, (AFRATIS et al., 2012). A interação das células que formam o tecido conjuntivo circundante às células cancerígenas influencia muito o crescimento e a progressão do câncer. As células tumorais liberam

citocinas e fatores de crescimento, os quais influenciam as capacidades migratórias, proliferativas e de sobrevivência das células malignas (AFRATIS et al., 2012).

Um estudo realizado *in vitro* relatou atividade antiproliferativa positivo de GAGs sulfatados extraídos da lagosta da Noruega (*Neprops norvegicus*) contra células de carcinoma do cólon humano. Esses GAGs sulfatados eram compostos por SH e SD, mas não estavam separados, impossibilitando atribuir atividades a compostos específicos (SAYARI et al., 2016). Estudos com ratos confirmam o potencial inibitório de sulfato de condroitina-E (SCE) extraído de lula. Células de osteossarcoma capazes de formar tumores no fígado de camundongos continha grande proporção de SC/SD, a formação do tumor foi inibida pela pré-administração de SCE de lulas (BASAPPA et al., 2009).

Como parte dos proteoglicanos, os GAGs estão envolvidos recrutando os leucócitos nos vasos sanguíneos e facilitando sua migração através do endotélio para o tecido ferido. A inflamação nada mais é do que uma resposta ofensiva do organismo á uma lesão, que é alcançada com o movimento dos glóbulos brancos para o local do dano (POMIN, 2015). Possivelmente relacionados às suas propriedades anticoagulantes, os GAGs são considerados benéficos contra processos inflamatórios (MOUSAVI et al., 2015; ODUAH et al., 2016).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL

As escamas foram fornecidas por uma indústria de abate e processamento de tilápia, localizada no Sudoeste do estado do Paraná. No local, são abatidos em média 10.000 Kg/dia da espécie. Foram coletados 5 kg do subproduto, que foi lavado em água corrente, congelado e transportado sob refrigeração ao Laboratório de Tecnologia de Pescados da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus de Francisco Beltrão (FB).

### 4.2. MÉTODOS

#### 4.2.1. Composição Proximal Da Matéria Prima

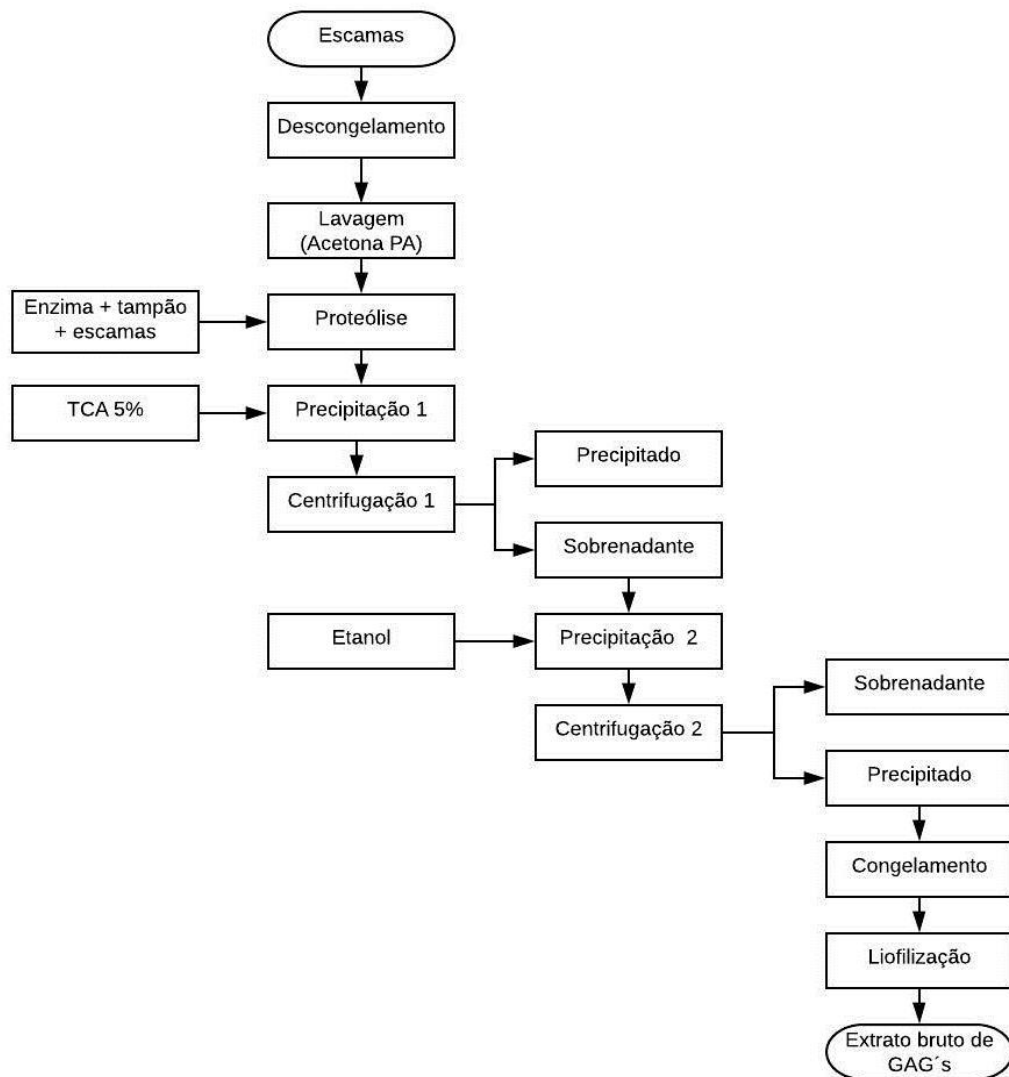
Realizou-se a análise de composição proximal, na qual foi avaliado o conteúdo de umidade de acordo com o método ISO 1442, proteína bruta ISO 1871, lipídeos NMKL 181, resíduo mineral fixo conforme a ISO 936 (BRASIL, 2017) e carboidratos (BRASIL, 2011).

#### 4.2.2. Extração Dos Glicosaminoglicanos

As escamas (5 Kg) foram descongeladas sob refrigeração e desengorduradas com 1,0 L de acetona (PA). Em seguida, parte da amostra (110 g) foi submetida à proteólise mediante a ação da enzima papaína (80 g) e 7 L de tampão fosfato – cisteína 0,05M em pH 6,5 (CARDOSO et al., 1992), na temperatura de 60 °C. Foram utilizadas 80g de enzima, 110g de escamas e 7 L de tampão fosfato – cisteína 0,05M, pH 6,5. Após 48 h de digestão as escamas

foram submetidas a uma etapa de trituração, em turbo processador industrial (Skysem, modelo LB-15MB) por 18 minutos (min). O processo de hidrólise teve sequência a 60°C, sob condições controladas de temperatura, com duração total de 14 dias (Figura 5).

Após a hidrólise enzimática, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA 5% em água destilada), por 20 min em banho de gelo. Em seguida a amostra foi centrifugada a 3200 rpm por 20 min e separado o sobrenadante. Ao sobrenadante, foram adicionados sob agitação 2,5 volumes de etanol e mantido em repouso por 24 horas a uma temperatura de -20°C. Na sequência, a amostra foi novamente centrifugada, o precipitado, separado e liofilizado para a obtenção do extrato bruto de GAGs.



**Figura 5 - Fluxograma que contempla o processo de extração dos GAGs**



#### 4.2.2.1. Rendimento bruto

O rendimento foi calculado considerando o extrato bruto, conforme a equação 1.

$$RB (\%) = \frac{PSE}{PSA} * 100(1)$$

Onde: RB: rendimento bruto (%); PSE: peso seco extrato bruto (g); PSA: peso seco da amostra (g).

#### 4.2.3. Purificação Dos Glicosaminoglicanos Por Cromatografia De Troca Iônica

O extrato bruto contendo GAGs foi fracionado utilizando cromatografia de troca iônica em coluna clássica (3,5 cm x 20 cm) empacotada com resina DEAE *Sepharose Fast Flow* estabilizada previamente com tampão acetato (50 mM) em pH 5,0. Uma alíquota do extrato bruto (15 mg) foi solubilizada em 10 mL água destilada e aplicada na coluna. A coluna foi eluída em *Stepwise* com solução tampão acetato (50 mM em pH 5,0), acrescida de diferentes concentrações de NaCl como fases móveis (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0). Foram coletadas automaticamente em tubos de ensaio (aproximadamente 5 mL). As frações foram monitoradas pela condutividade (alíquota de 50 ul da amostra em 5 mL de água destilada), utilizando-se condutivímetro de bancada (TECNOPON-MOD mCA 150).

##### 4.2.3.1. Determinação do ácido urônico

As frações coletadas foram analisadas quanto ao conteúdo de ácido urônico (DISCHE, 1946). Foram utilizados 100 µL da amostra na qual se adicionou 1 mL da solução de tetraborato de sódio 0,025 M (em ácido sulfúrico), a amostra foi então aquecida a 100°C por 10 min. Em seguida foi arrefecida e adicionou-se 40 uL da solução de carbazol 0,125% (em etanol). A amostra foi submetida a novo aquecimento de 100 °C por 15 min com subsequente resfriamento. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (THERMOSPECTRONIC) a um comprimento de onda de 530 nm.

##### 4.2.3.2. Determinação de GAGs sulfatados com o reagente DMB

As frações amostrais foram avaliadas quanto à presença de grupamentos sulfatado, com o reagente 1-9dimetimetileno (DMB). Foram utilizados 40 µL da amostra, na qual foi adicionado 1 mL da solução de DMB, seguido de leitura em espectrofotômetro UV-VIS (THERMOSPECTRONIC) a um comprimento de onda de 535 nm.

#### 4.2.4. Agrupamento E Dessalinização Das Frações Obtidas Por Cromatografia De Troca Iônica

As frações amostrais foram agrupadas de acordo com o perfil gráfico obtido na determinação do ácido urônico, GAGs sulfatados e condutividade elétrica. As frações agrupadas foram dialisadas através de uma membrana de corte de 3.5 kDa usando água destilada. A diálise teve duração de aproximadamente 6 horas. As frações dialisadas foram congeladas e liofilizadas, obtendo assim as frações purificadas de GAGs.

#### 4.2.5. Caracterização

##### 4.2.5.1. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,55%, preparado em tampão PDA (1-3 diaminopropano) em pH 9,0. Utilizou-se uma cuba com 5 compartimentos, onde nos compartimentos 1 e 5 foi colocado tampão PDA, no compartimento 2 e 4 foi colocado gel de agarose, e no compartimento 3 foi colocado éter de petróleo. Os eletrodos foram dispostos de modo que o polo negativo foi acoplado no compartimento 1 e o polo positivo no compartimento 5. As amostras (5 mg/mL) e o padrão de sulfato de condroitina (SC-4 Sigma Aldrich) (5 mg/mL) foram diluídos em água destilada e 5µL foi aplicado no gel. A corrida teve duração de 160 min, a 100 V e 80 mA a uma temperatura de 5 °C. Após a corrida, o gel foi tratado com Brometo Cetavlon 0,1% (em água destilada) durante 120 min a fim de precipitar os GAGs. Em seguida, o gel foi seco com o auxílio de uma lâmpada incandescente e circulação de ar até formar uma película fina, cerca de 120 min. Depois de seca a película de gel foi corada com azul de toluidina 0,1% (preparado em ácido acético 1% e etanol 50%), por 15 min. Em seguida, foi realizado o procedimento de descoloração, em solução descorante (1% de ácido acético e 50% de etanol), por cerca de 10 min.

#### 4.2.5.2. Ressonância magnética nuclear RMN

A análise foi realizada em espectrômetro BRUKER modelo DPX-400SF a fim de obterem-se os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Foi utilizado o solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ ), tendo como referência interna para  $\delta = 0$  ppm 4,4dimetil-4silapentano-1-sulfonato de sódio. De maneira geral, os parâmetros experimentais do equipamento foram: 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 100,23 para  $^{13}\text{C}$ ; largura de pulso  $90^\circ$ , 8.0  $\mu\text{s}$  ( $^{13}\text{C}$ ); janela espectral 965 Hz ( $^1\text{H}$ ) e 5000 Hz ( $^{13}\text{C}$ ); número de varreduras 8-32 para  $^1\text{H}$  e 2000-20000 para  $^{13}\text{C}$ , dependendo do composto; número de pontos 65536 com resolução digital Hz/ponto  $^1\text{H}$  igual a 0,677065 ( $^1\text{H}$ ) e 0,371260 ( $^{13}\text{C}$ ); temperatura de  $50^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.5.3. Determinação do grau de substituição (GS) por grupos sulfato

A determinação do GS na amostra foi realizada do método turbidimétrico descrito por Dodgson e Price (1962). Em 40 mL de água destilada aquecida ( $60 - 70^\circ\text{C}$ ) foram solubilizados 200 mg de gelatina (5 mg/mL). A solução foi mantida em refrigerador por 12h. Em seguida foram adicionados 200 mg de cloreto de bário sob agitação lenta e novamente manteve-se a solução sob refrigeração por mais 2h. A fração polissacarídica (1,2 mg), foi submetida a hidrólise, utilizando 1 mL de HCl 1 N, a  $105^\circ\text{C} - 110^\circ\text{C}$  por 5h. A fração hidrolisada (0,2 mL) foi tratada com 3,8 mL de ácido tricloroacético 3% (p/v) e com 1,0 mL de solução de cloreto de bário-gelatina. Após 15 min em temperatura ambiente, foi determinada a absorbância em espectrofotômetro (360 nm) para a amostra (triplicata). O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 180  $\mu\text{g/mL}$ ). Em seguida, o grau de substituição dos polissacarídeos por grupos sulfato foi calculado utilizando a equação 2 (WHISTLER; SPENCER, 1964).

$$GS = \frac{138*S}{3200-(102*S)} \quad (2)$$

Onde: 138: massa molar média das unidades monossacarídica padrão; 3200: massa atômica do enxofre (32 g) x 100; 102: representa 1 mol do éster substituinte ( $\text{SO}_3\text{Na}$ ); S: representa o teor de enxofre dado em porcentagem;

#### 4.2.6. Avaliação Da Bioatividade Dos Glicosaminoglicanos

##### 4.2.6.1. Atividade anticoagulante in vitro

A atividade anticoagulante da amostra foi determinada *in vitro* pelo ensaio do tempo de protrombina parcial ativada (aPTT/*activated partial thromboplastin time*), por comparação com a atividade de um padrão de heparina não-fracionada. Uma curva de calibração (aPTT x concentração de heparina) foi obtida utilizando concentrações variadas de um padrão internacional de heparina suína não-fracionada com 200,47 UI/mg de atividade (6th International Standard 2009). Para a análise foi utilizado o coagulômetro COAG-A-MATE® XM (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC) e o kit HemosiL® (Instrumentation Laboratory) para aPTT. Plasma ovino citratado (100 µL) (lote: 044/11 DFI – UFSM) foi incubado a 37 °C com solução salina ou polissacarídeo por 1 minuto (q.s.p. 100 µL). Em seguida, cefalina de coelho foi adicionada (100 µL). Após 2,5 min, CaCl<sub>2</sub> a 25 mM (100 µL) foi adicionado e o tempo de coagulação determinado. Cada amostra foi analisada em duplicata.

##### 4.2.6.2. Ensaio de Inibição da Atividade Anticoagulante de SC com protamina

Para a análise foi utilizado o coagulômetro COAG-A-MATE® XM (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC) e o kit HemosiL® (Instrumentation Laboratory) para aPTT. Plasma ovino (100 µL) (lote: 044/11 DFI – UFSM) foi incubado a 37 °C por 1 minuto com solução salina ou amostra (9,6 µg/mL), acrescidos de protamina (9,6 µg/mL) (amostra + protamina = 100 µL). Em seguida, cefalina de coelho foi adicionada (100 µL). Após 2,5 min, CaCl<sub>2</sub> a 25 mM (100 µL) foi adicionado e o tempo de coagulação determinado. Cada amostra foi analisada em duplicata

##### 4.2.6.3. Teste de citotoxicidade/atividade antitumoral

###### 4.2.6.3.1. *Linhagens Celulares*

As células SH-SY5Y, derivadas de linhagem celular de neuroblastoma humano, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA) e 1mL/L de antibiótico/solução antimicótica, e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (5%, 95% de umidade) a 37 °C.

As células HTC, derivadas de hepatoma de *Rattus norvegicus*, foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA) e 1 mL/L de antibiótico/solução antimicótica, e incubadas em estufa BOD a 37 °C.

#### 4.2.6.3.2. *Solução Tratamento*

A amostra foi diluída em meio de cultura DMEM e então, foi utilizada para o preparo das seguintes concentrações tratamentos: 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL de meio de cultura.

#### 4.2.6.3.3. *Ensaio de citotoxicidade/atividade antitumoral (MTT)*

O ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazoliumbromide] seguiu o protocolo sugerido por Mosmann (1983). Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas 2x10<sup>4</sup> células SH-SY5Y ou HTC, com exceção dos poços controle sem células (branco). As células foram cultivadas por 24 horas com 100 µL de meio de cultura. Após este período, o meio de cultura da placa foi descartado e adicionado 100µL de meio novo com os tratamentos: controle negativo (CO-) (meio de cultura), tratamento com o agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS) (CO+) (concentração final de 75 µM para as células SH-SY5Y e 150 µM para as células HTC), e as diferentes concentrações da amostra.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas e, após este tempo, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio livre de soro, acrescido de MTT na concentração de 0,167 mg/mL. A placa foi incubada por mais 4 horas e, na sequência, o meio contendo

MTT foi descartado e aos poços foram adicionados 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), ocorrendo a diluição dos cristais de formazan formados. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (FlexStation) a 550 nm e os dados das médias das absorbâncias obtidas nas três repetições biológicas foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet ( $\alpha=0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $n=3$ ), pelo programa GraphPadInStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados através da equação 3.

$$VC = \left( \frac{ABS_T}{ABS_C} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde: VC: Viabilidade celular [%];  $ABS_T$ : Absorbância média do tratamento;  $ABS_C$ : Absorbância média do controle negativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA MATÉRIA PRIMA

As escamas de tilápia apresentaram teor de umidade de (52,46%), proteína bruta (29,23%), lipídios (< 0,10%), resíduo mineral fixo (18,90%) e carboidratos (0,80%). Apesar do baixo percentual de hidratos de carbono, compostos sacarídeos de interesse e com elevado valor comercial, podem ser isolados. Um dos grandes desafios da indústria pesqueira tem sido encontrar possíveis alternativas para o aproveitamento integral dos seus subprodutos, e consequente agregação de valor ao processo.

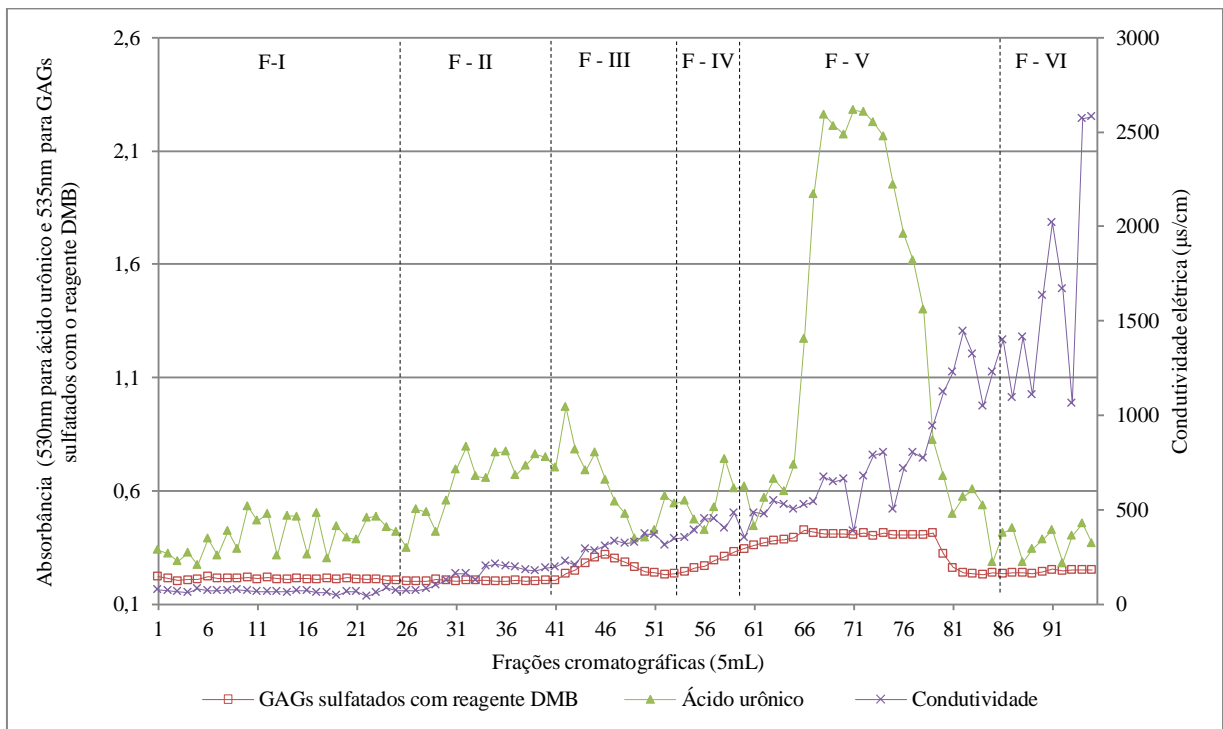
### 5.2. EXTRAÇÃO DOS GAGS

O processo de extração dos GAGs teve uma duração de 14 dias, por se tratar de um material altamente resistente, devido a sua composição, e consequentemente de difícil degradação. Todo o processo de hidrólise aconteceu em temperatura controlada de 60°C e resultou num rendimento bruto de 0,86%.

Nogueira (2019) obteve um rendimento de 0,18% de extrato bruto das vísceras de Pacu e 0,15% das vísceras de tilápia. Liu et al. (2018) extraiu GAGs de caramujos gigantes (*Fulica bowdich*) e obteve um rendimento final de 1% de peso seco. Sendo assim, o rendimento de extração de polissacarídeos é muito variável devido a vários fatores, como condições ambientais, variação sazonal, fatores fisiológicos e métodos de extração (KRICHEN, et al., 2018).

### 5.3. PURIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A amostra bruta de GAGs obtida pela proteólise com papaína foi eluída em coluna de troca iônica (DEAE - Sepharose Fast Flow), tendo como fase móvel uma solução com gradiente linear de NaCl, que variou de 0,25 M até 4,0 M. Foram obtidas 95 frações (5 mL) que foram avaliadas quanto a condutividade elétrica, determinação da presença de ácido urônico pelo método do carbazol e GAGs sulfatados com utilização do corante Azul de DMB (Figura 6).



**Figura 6 - Determinação de ácido urônico, GAGs sulfatados com o reagente DMB e condutividade elétrica das amostras de escamas de tilápia**

A análise dos perfis obtidos em relação aos teores de ácido urônico e GAGs sulfatados por DMB levaram ao agrupamento das 95 frações obtidas em seis novas frações (tabela 1).



**Tabela 1- Frações de GAGs obtidos de escamas de tilápia separados de acordo com o gradiente de NaCl e os perfis de ácido urônico e GAGs sulfados com o reagente DMB**

Fração	Amostra (5mL)	[NaCl]
I	1-25	0,25 M
II	26-40	0,50 M
III	41-53	0,75 M
IV	54-59	1,00 M
V	60-85	2,00 M
VI	86-95	4,00 M

Fonte: Próprio autor

Na purificação de GAGs por cromatografia de troca iônica, a separação está relacionada à capacidade de interação das moléculas do analito com a fase estacionária, quanto maior for a interação mais tempo ele irá demorar a eluir da coluna (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006). Os GAGs por possuírem cargas negativas, interagem com a resina, neste caso, composta por esferas de agarose e dietilaminoetil (DEAE), carregadas positivamente e são trocados por íons cloreto presentes no eluente. Desta forma, a ordem de eluição está relacionada com o aumento da concentração de NaCl, como observado no aumento da condutividade elétrica das frações. .

De acordo com Bitter e Muir (1962), o método do reagente carbazol é muito eficiente para detectar ácido urônico. Possibilita a detecção do composto nas suas diferentes conformações espaciais, tanto na forma de ácido  $\beta$ -D-glucurônico e  $\alpha$ -L-idurônico. No presente estudo, constatou-se a presença de ácido urônico na amostra analisada após o fracionamento por cromatografia de troca aniônica (Figura 7). Observou-se um pico majoritário nas frações II e III, e um pico na fração V, correspondentes as concentrações de NaCl de 0,5 M, 0,75 M e 2,0 M, respectivamente. Os picos detectados para a amostra de escama podem corresponder as diferentes conformações do ácido urônico, uma vez que o método não é seletivo. Dentre os GAGs mais comuns, o único que não apresenta ácido urônico em nenhuma de suas conformações é o sulfato de queratana (SAMPAIO; NADER, 2006). Desta forma, os resultados de absorbância obtidos indicam somente a presença de GAGs nas frações mas não consegue diferenciá-los por tipo.

Diferente da análise com o reagente de carbazol que indica a presença do ácido urônico na amostra, a análise com o reagente DMB possibilita a identificação de GAGs

sulfatados. O corante DMB é um corante catiônico (STONE, 1998) possui propriedades metacromáticas, ou seja, tem uma aparência azulada na ausência de GAGs sulfatados e torna-se lilás na presença dessas substâncias (TEMPLETON, 1988). Os resultados da análise de DMB, obtidos das frações da cromatografia de troca iônica apontam a presença de GAGs sulfatados, por meio de dois picos majoritários observados na figura 6. Os picos correspondem às frações III e V, eluídas a uma concentração de 0,75 e 2,0 M, respectivamente, observados também pela análise com reagente de carbazol. Esses picos praticamente coincidem nos tempos de eluição e nas concentrações de NaCl. Sendo assim, pode-se dizer que os resultados da análise de GAGs sulfatados, corroboram com os resultados da análise de ácido urônico. Ou seja, se identificamos a presença de ácido urônico, por carbazol, certificamo-nos da presença de GAGs, e com a reação metacromática do corante DMB, podemos assegurar que esses GAGs apresentam grupamentos sulfatados.

#### 5.4. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

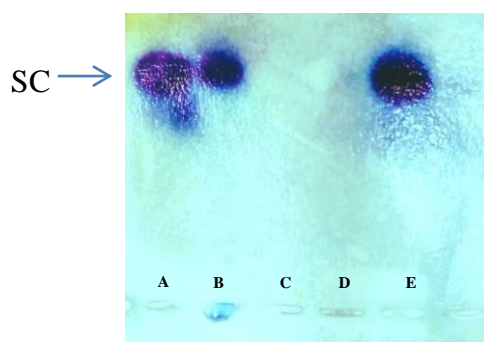
Após a etapa de purificação por cromatografia de troca iônica, as frações II, III e V, que apresentaram picos majoritários nas determinações de ácido urônico e de GAGs sulfatados, foram caracterizadas por eletroforese em gel e ressonância magnética nuclear.

##### 5.4.1. Eletroforese Em Gel De Agarose

Os resultados da eletroforese em gel indicam os possíveis GAGs presentes nas escamas. A eletroforese foi utilizada com o intuito de separar os diferentes GAGs por intermédio da interação entre a diamina presente no tampão PDA e as cargas negativas dos GAGs. Os GAGs mais sulfatados, ou seja, que apresentam maior densidade de cargas negativas migram menos no gel, pois tem uma maior interação com a diamina (DIETRICH e DIETRICH, 1976).

No presente estudo, o extrato bruto e as frações II, III e V foram diluídas em água destilada (5 mg/mL) assim como o padrão de SC e aplicadas em gel de agarose. Observa-se

na figura 7, a presença de bandas metacromáticas características de sulfato de condroitina (SC). O tempo de corrida do padrão (A) e das amostras (B e E) são equivalentes, ou seja, as características eletronegativas do padrão SC e das amostras se assemelham, pois as interações dos grupamentos sulfatados com a diamina presente no tampão ocorrem na mesma intensidade.



**Figura 7 - Perfil eletroforético em gel de agarose da amostra bruta de escamas e das frações obtidas na cromatografia de troca iônica.**

Onde A: Padrão de sulfato de condroitina; B: Extrato bruto de escamas; C: Fração II; D: Fração III; E: Fração V

O corante azul de toluidina é uma tiazina com propriedades metacromáticas, é usado para detectar GAGs devido a sua afinidade por moléculas ácidas (PERKIN, 1879; SRIDHARAN, SHANKAR, 2012). O princípio da metacromasia observado nas corridas A, B e E, baseia-se na reação do corante com os grupamentos eletronegativos, produzindo cores de diferentes comprimentos de onda de acordo com a concentração de GAGs (DRUPY, WALLINGTON, 1980; SRIDHARAN, SHANKAR, 2012).

Esperava-se revelar a presença de GAGs sulfatados nas corridas, C e D, que correspondem às frações II e III, porém a reação de coloração só foi observada na corrida E, que corresponde a fração V. Segundo Volpi e Maccari (2002), o método é capaz de detectar até mesmo baixos níveis de GAGs sulfatados, porém os resultados nos indicam provavelmente uma concentração muito baixa, o que não possibilitou a detecção.

No presente estudo, somente a fração que eluiu a 2,0 M (fração V) e a amostra bruta foram reveladas com a análise de eletroforese, e estas indicaram a possível presença de SC. Da Rosa (2008) identificou a presença de SC e SD em cristas de frango, compostos estes que eluíram a uma concentração salina acima de 0,5 M, ainda, identificou majoritariamente AH, com o uso do corante *Stains All*, com perfil de eluição a 0,4 M. A eluição da fração V aconteceu a uma concentração salina de 2,0 M, possivelmente pelo fato dos GAGs sulfatados

apresentarem maior densidade de cargas negativas e conseqüentemente maior interação com as caras positivas da resina.

A corrida B, referente à amostra bruta, representa uma reação metacromática visualmente menos intensa que a observada na corrida E (figura 7). Isso se deve provavelmente a concentração de GAGs sulfatados presentes. A amostra bruta, por não ter sido purificada apresenta uma concentração menor quando comparada a Fração V, que foi purificada, e conseqüentemente, possui uma maior concentração de sulfato de condroitina.

#### 5.4.2. Ressonância Magnética Nuclear – RMN

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta útil na caracterização de estruturas de carboidratos onde parâmetros como conteúdo de açúcar, conformação de anel, ligações glicosídicas e padrão de sulfatação podem ser determinados pela análise dos deslocamentos químicos, constantes de acoplamento e correlações a curta e longa distância. Ressalta-se que a técnica também apresenta a vantagem de não destruir a amostra.

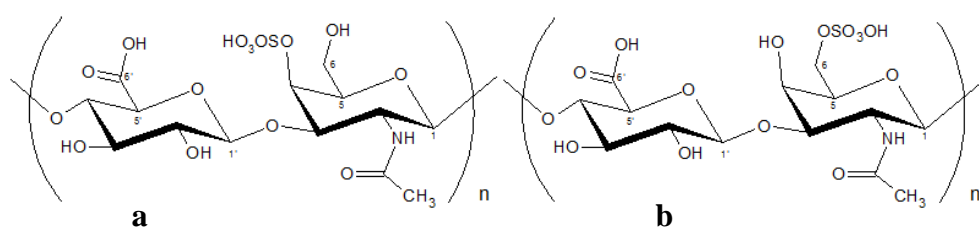
As frações obtidas a partir do fracionamento dos GAGs totais por coluna de troca iônica foram submetidas à análise de RMN uni e bidimensional. Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos foram analisados, porém somente a fração V se mostrou mais pura entre as demais, apresentando sinais característicos para GAGs sulfatados. Dessa forma, optou-se pela continuidade da caracterização da fração V. Visto que as demais frações não indicaram a presença significativa de GAGs.

### 5.5. CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO V

A fração V foi caracterizada por ressonância magnética nuclear e pela determinação do grau de substituição por grupos sulfato (GS).

#### 5.5.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A fração V foi submetida a análise de RMN uni e bidimensional. No espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 11; Tabela 2) vários sinais se apresentaram duplicados o que indicou que a fração V é constituída de uma mistura de sulfatos de condroitina (SCs). Para se separar os sinais correspondentes a cada estrutura, o espectro foi comparado ao obtido de padrão comercial de SC4 (Sigma Aldrich), analisando-se as coincidências de deslocamento químico (Tabela 2). A intensidade relativa dos sinais também foi usada para as atribuições, mas não foi possível calcular a porcentagem relativa de cada SC pelo espectro de  $^1\text{H}$  por causa da sobreposição de sinais. A interpretação de dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY e HSQC comparados aos encontrados na literatura (HUCKERBY et al. 2001; MUCCI e VOLPI, 2000; WELTI et al, 1979; HAMER e PERLIN, 1976) levaram a caracterização da F-V como sendo uma mistura de sulfato de condroitina 4 (SC4) e sulfato de condroitina 6 (SC6).



**Figura 8 - Estrutura do sulfato de condroitina 4 (a) e sulfato de condroitina 6 (b)**

Vários sinais nos espectros de RMN da SC4 e SC6 são muito similares, pois as diferenças estruturais nestes polímeros diferem apenas na localização do grupo sulfato da unidade N-acetilgalactosamina (GalNAc), 4 e 6, respectivamente. A maior semelhança é encontrada nas unidades de ácido D-glucorônico (GlcA) que são iguais em ambas os SCs. Por outro lado, os sinais relativos as posições 4 e 6 da GalNAc-SO<sub>3</sub>OH tem deslocamentos bem distintos que podem ser usados para diferenciar os sulfatos de condroitina (figura 8a, b).

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  foram atribuídos com auxílio das correlações bidimensionais apresentadas no espectro de correlações (COSY) com a contribuição dos acoplamentos do espectro de infravermelho (HSQC) sendo que este último experimento contribui também para a atribuição dos sinais de  $^{13}\text{C}$ . O espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 9, 10; Tabela 2) apresenta os sinais divididos em duas regiões espectrais que são características para os GAGs. Na região compreendida entre os deslocamentos químicos  $\delta$  2,0 e 2,5 ppm encontram-se os sinais relativos aos hidrogênios do grupo acetamida. Entre  $\delta$  3,0 e 5,0 ppm observam-se

os sinais respectivos aos hidrogênios anoméricos ( $\delta$  4,0 a 5,0 ppm) bem como os demais sinais de  $^1\text{H}$  das unidades glicosídicas. Esta última região, que é a de maior utilidade para se caracterizar os diferentes tipos de SCs, é de difícil atribuição, pois os sinais comumente se mostram sobrepostos, o que a torna bastante saturada.

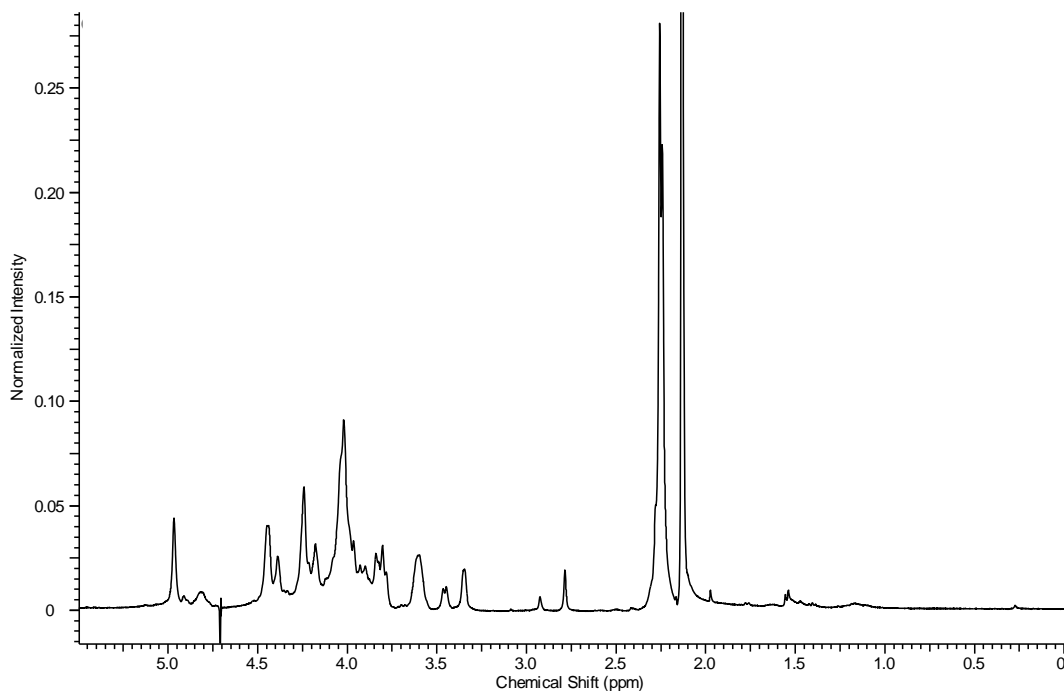


Figura 9 - Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) da F-V em solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ )

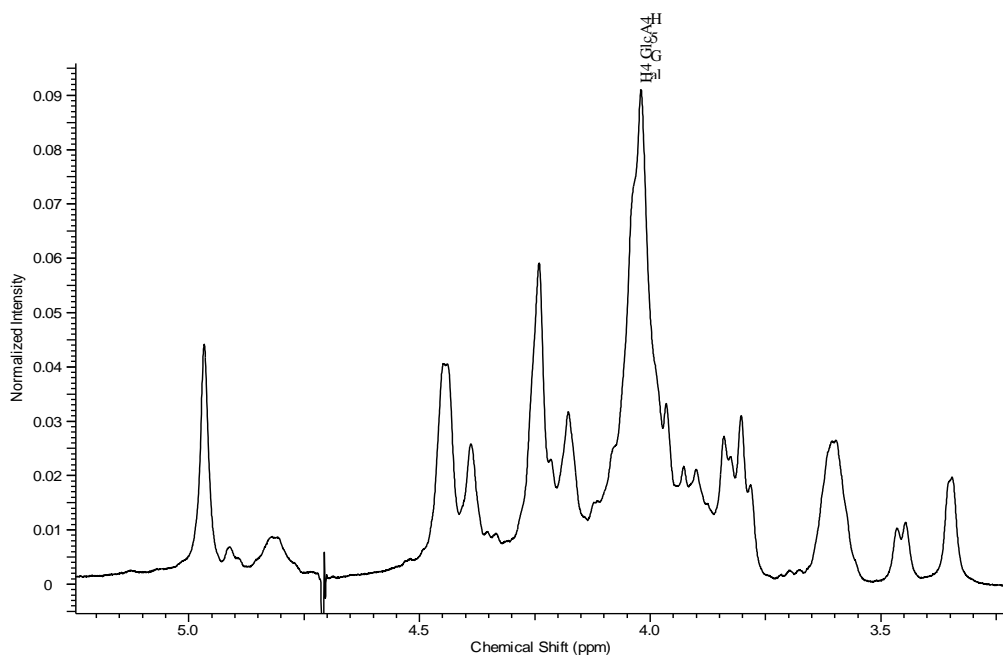
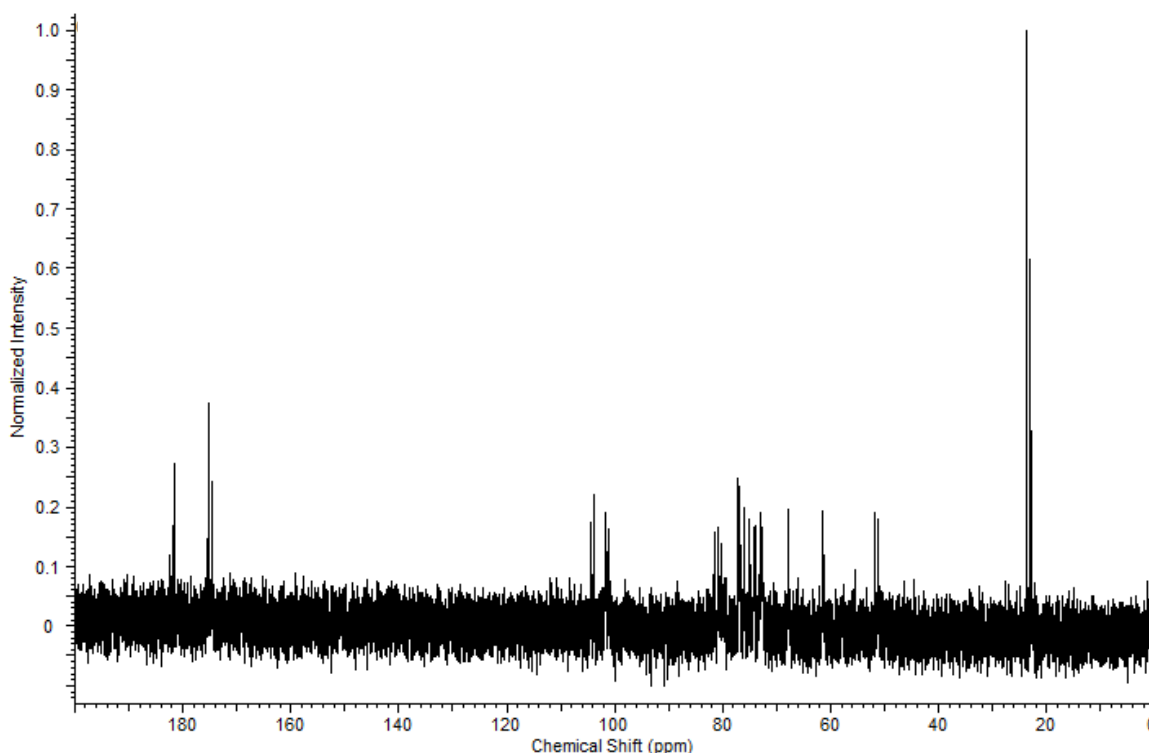


Figura 10 - Espectro parcial ampliado de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) da F-V em solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ )

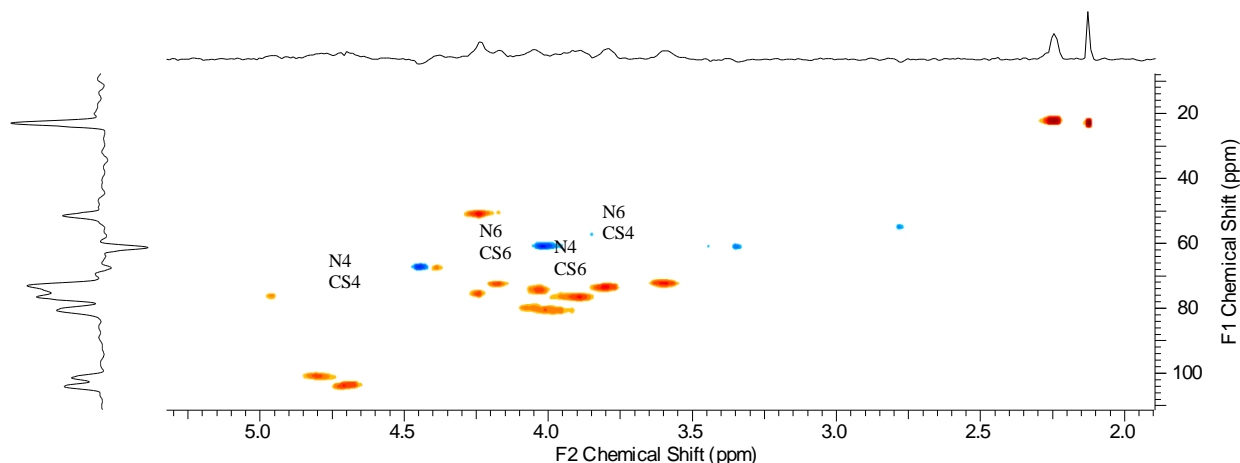


**Figura 11 - Espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) da F - V em solvente deuterado ( $\text{D}_2\text{O}$ )**

No espectro de  $^{13}\text{C}$  foi observado a presença de dois pares de sinais em  $\delta\text{C}$  101,18 e 101,60 ppm e 103,91 e 104,45 e ppm que foram atribuídos aos carbonos anoméricos das unidades GalNAc e GlcA dos SC4 e SC6, respectivamente, com auxílio dos acoplamentos observados nos HSQC e dados da literatura (HUCKERBY et al. 2001; HAMER, PERLIN, 1976). No espectro de  $^1\text{H}$ , os sinais relativos aos H-1 das unidades GlcA estão sobrepostos pelo sinal do solvente. Sinais relativos às carbonilas dos grupos acetamida foram observados em torno de  $\delta\text{C}$  175 e  $\delta\text{C}$  175 ppm para os grupos carboxila. Os demais sinais de carbono para as unidades GalNAc e GlcA das SC4 e SC6 foram observados na região de  $\delta\text{C}$  50 a 85 ppm (figura 11)

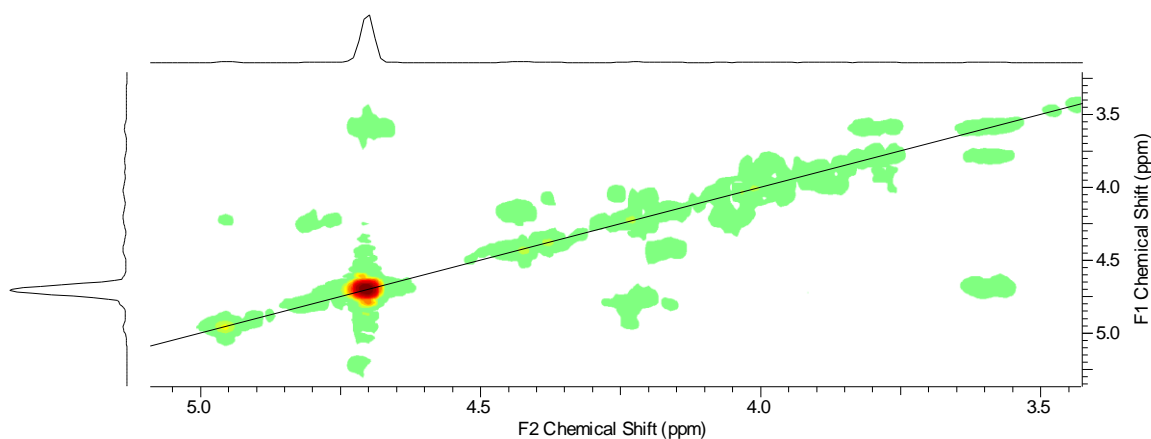
O posicionamento dos grupos sulfatos em 4 e 6 para as unidades GalNAc foi proposto com base nos deslocamentos químicos dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e acoplamentos observados no espectro HSQC. Foi levada em consideração a desblindagem proporcionada pelo grupo éster sulfato que leva a um incremento nos deslocamentos químicos de sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos elementos na posição onde está inserido o grupo, ou seja, posições 4 e 6 das unidades GalNAc. Desta forma, foram observados sinais em  $\delta\text{H}$  4,97 e 4,22 ppm que foram atribuídos aos H-4 da GalNAc-4- $\text{SO}_3\text{OH}$  e GalNAc-6- $\text{SO}_3\text{OH}$ , respectivamente. Da mesma

forma, os sinais em  $\delta$  H 3,83 e 4,26 e foram atribuídos aos H-6 da GalNac-4-SO<sub>3</sub>OH e GalNac-6-SO<sub>3</sub>OH. Os sinais de <sup>13</sup>C para C-4 e C-6 das unidades GalNacSO<sub>3</sub>OH foram atribuídos usando-se as correlações observadas no espectro de HSQC. As demais correlações podem ser observadas na figura 12.



**Figura 12 - Espectro de infravermelho (HSQC) da F - V em solvente deuterado (D<sub>2</sub>O)**

Apesar da sobreposição de sinais que dificultou a localização individual dos hidrogênios para cada unidade de dos sulfatos de condroitina, o espectro de correlação (COSY) se mostrou útil para reforçar a atribuição de vários sinais de <sup>1</sup>H. As correlações mais claras são as apresentadas pelo H-4 da unidade GalNac4 bem como dos H-2 e H-3 das unidades GlcA 4 e 6, que são apresentados na figura 13.



**Figura 13 - Espectro de correlação (COSY) da F - V em solvente deuterado (D<sub>2</sub>O)**



Na tabela 2 apresenta-se a análise de coincidências dos deslocamentos químicos obtidas para o espectro da amostra (fração V), do padrão comercial de SC4 (SIGMA), bem como, os dados consultados na literatura.

**Tabela 2- Dados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da F - V comparados com os dados de  $^{13}\text{C}$  da literatura para SC4 e SC6 (HUCKERBY et al. 2001) e padrão de SC4**

	CS4				CS6		
	F-V		Padrão	Ref.	F-V		Ref.
N	$\delta_c$		$\delta_c$	$\delta_c$	$\delta_H$	$\delta_c$	$\delta_c$
	GalNAc				GalNAc		
1	4,76	101,18	101,34	103,59	4,81	101,6	104,28
2	4,25	51,91	51,96	54,94	4,25	51,21	53,93
3	4,23	75,90	75,96	78,62	4,06	80,27	82,68
4	4,97	76,70	76,95	79,12	4,18	72,86	70,17
5	3,97	74,95	74,89	77,69	4,02	74,25	75,70
6	4,00	61,32	61,46	63,98	4,45	67,83	70,36
Me	2,25	22,94	22,94		2,13 (s)	23,65	
Ac		175,28	175,33			181,61	
	GlcA				GlcA		
1	NA	103,91	104,10	105,94	NA	104,45	105,56
2	3,60	72,67	72,78	75,96	3,65	72,67	75,85
3	3,83	74,00	74,07	76,78	3,80	74,12	77,08
4	4,00	80,76	80,92	83,07	3,97	81,42	84,26
5	3,93	77,06	76,71	79,09	3,90	76,84	78,83
6		174,50	174,58			174,64	

Os dados apresentados pelo RMN para a amostra (fração V) são similares aos obtidos para o padrão de sulfato de condroitina – 4 (SC4), bem como com os descritos na literatura (HUCKERBY et al. 2001; MUCCI e VOLPI, 2000; WELTI et al, 1979; HAMER e PERLIN, 1976) comprovando a identificação da amostra como sendo uma mistura de SC4 e SC6.

### 5.5.2. Determinação Do Grau De Substituição Por Grupos Sulfato (GS)

Conhecer o grau de substituição (GS) da molécula é importante, visto que a atividade anticoagulante resulta da interação de cargas negativas dos grupamentos sulfato, com as cargas positivas de sequencias peptídicas de proteínas reguladoras do processo de coagulação sanguínea, principalmente a antitrombina (AT) e o cofator II de heparina (HCII) (DORE et al., 2013). Relacionar a quantidade desses grupamentos sulfato se torna um ponto chave na avaliação do potencial da molécula.

Sabendo disso o GS foi determinado utilizando a fórmula descrita por Whistler e Spencer (1964), na qual inicialmente precisou ser quantificado o teor de sulfato dos polissacarídeos pelo método turbidimétrico de Dodgson e Price (1962). O percentual de sulfato encontrado foi de 9,82%, enquanto que o grau de substituição (GS) por grupos sulfato foi de 0,146. Desse modo, verifica-se que na F - V existem em média 0,146 grupos sulfato por unidade monomérica.

A resposta anticoagulante de polissacarídeos está relacionada com diferentes fatores, como o tipo do monossacarídeo, ligação glicosídica, conformação da cadeia polimérica e o peso molecular. (LIANG et al., 2014; LU et al., 2012; MAAS et al., 2012). Além desses fatores, os polissacarídeos respondem de maneira singular quanto à inserção/localização do grupamento sulfato e quando interagem com proteínas anticoagulantes. O resultado disso é que podemos encontrar diferentes relações entre a quantidade de sulfato e potencial anticoagulante (DORE, et al., 2013).

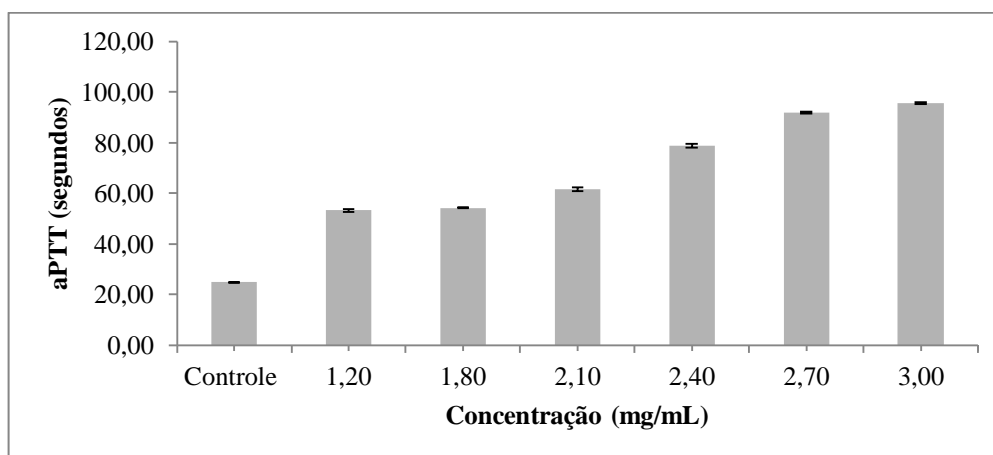
## 5.6. AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DA FRAÇÃO V (F – V)

### 5.6.1. Atividade Anticoagulante *In Vitro*

A partir da informação que a amostra extraída de escamas de tilápia, apresentou GS (0,146), realizou-se a investigação para verificar se os grupamentos sulfato dessa amostra seriam

suficientes para conferir à molécula atividade anticoagulante. Para essa determinação realizou-se o ensaio do tempo de protrombina parcial ativada (aPTT, *activated partial thromboplastin time*).

A análise da atividade anticoagulante foi realizada com diferentes concentrações da F - V (1,2 – 3,0 mg/mL), composta basicamente por SC4 e SC6, (figura 14). Observa-se que a medida que aumenta a concentração dos polissacarídeos, ocorre também a elevação do tempo de aPTT.



**Figura 14 - Atividade anticoagulante pelo ensaio do tempo de protrombina parcial ativada (aPTT) com diferentes concentrações (1,20 a 3,00 mg/mL) da F - V**

Os dados tornam-se relevantes do ponto de vista de atividade anticoagulante, se apresentarem cerca de 2,5 vezes o tempo de aPTT apresentado pelo controle (salina). Sendo assim, as concentrações de 2,40 mg/mL, 2,70 mg/mL, 3,00 mg/mL, apresentaram aumento no tempo de aPTT e conseqüentemente na atividade anticoagulante, de 3,18, 3,71 e 3,86, vezes respectivamente, em comparação ao controle. As demais concentrações apresentaram elevação no tempo de aPTT, porém não acima de 2,5 vezes em relação ao controle.

Os dados de aPTT do presente estudo foram semelhantes aos relatados por Nogueira (2019), que identificou aumento de 2,3 a 3,3 vezes em relação ao controle nas amostras de vísceras de tilápia, porém a uma concentração de 0,25 mg/mL. Enfatizando que a melhor atividade anticoagulante foi identificada na fração de tilápia que apresentou SD e SH na sua composição. Liang et al., (2018) ressalta que as maiores atividades anticoagulante são características dos polissacarídeos sulfatados e na presença elevada de SD e SH. Porém o SC extraído de fontes alternativas e vem sendo testado, demonstrando bons efeitos anticoagulantes (MOU et al., 2017) e antitrombóticos (GUI et al., 2015).

### 5.6.2. Ensaio De Inibição Da Atividade Anticoagulante Do Sulfato De Condroitina Com Protamina

A protamina é uma proteína de baixo peso molecular, extraída do esperma de diferentes espécies de salmão e tem sido amplamente utilizada para reverter o efeito anticoagulante da heparina (AINLE et al., 2009). Por meio intravenoso, a protamina é administrado em pacientes que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos cardíacos e vasculares, onde 1 mg de protamina é capaz de neutralizar 1000 U de heparina (MAJERUS; TOLLEFSEN, 2006). Com o intuito de identificar um agente inibidor da ação anticoagulante da amostra, testou-se sua resposta frente à protamina, utilizando o mesmo ensaio de aPTT.

Conforme Barddal et al., (2015; 2020) nesse ensaio, o plasma na presença de salina coagula em aproximadamente 25 segundos, quando na presença de protamina esse tempo passa para 150 a 200s. Quando testada a heparina não fracionada na presença de igual concentração de protamina, o tempo de aPTT é similar ao controle, ou seja, inibe totalmente sua capacidade de manter o plasma fluido. Já a heparina de baixa massa, tem sua ação reduzida em aproximadamente 60%, ou seja, o tempo de aPTT é reduzido e o plasma coagula em menos tempo.

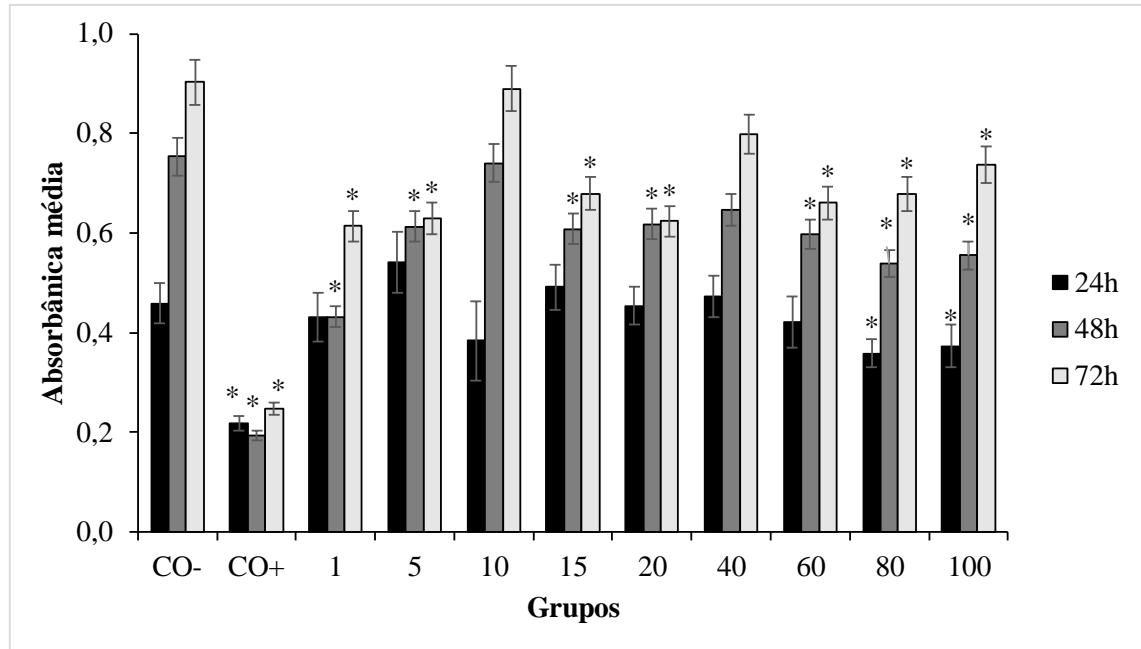
Quando analisada a F – V na presença de igual concentração de protamina (9,6 mg/mL), foi observado que o plasma se manteve fluido por todo o tempo do ensaio. Devido ao fato de o experimento ter sido feito em duplicata, são necessários mais estudos para chegar a conclusões sobre o comportamento da amostra, na presença de protamina. Aparentemente o que se pode sugerir, é apenas uma interação pró-anticoagulante entre a amostra e a protamina.

### 5.6.3. Teste De Citotoxicidade/Atividade Antitumoral

As drogas consolidadas no tratamento de câncer na sua grande maioria são invasivas e altamente prejudiciais para um amplo espectro de tecidos, sendo assim nos últimos anos, a busca por compostos antitumorais naturais ganhou considerável atenção (SAYARI et al., 2016).

Os resultados da Figura 15 apresentam as absorbâncias médias obtidas para as células de hepatoma de *Rattus norvegicus* tratadas com a F - V. A análise estatística dos dados mostra que no tempo de 24 horas as maiores concentrações (80 e 100 µg/mL) da amostra apresentaram efeito citotóxico para as células tumorais metabolizadoras de rato, pois

apresentaram absorvâncias médias significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que a do controle negativo. Inclusive, as viabilidades celulares destas concentrações foram as menores neste tempo de avaliação (80  $\mu\text{g/mL}$  = 78,20% e 100  $\mu\text{g/mL}$  = 81,25%) (Tabela 3).



**Figura 15 - Absorbâncias médias de células de hepatoma de *Rattus norvegicus* tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F - V ( $\mu\text{g/mL}$ ), por 24, 48 e 72 horas**

\* Resultado estatisticamente significativo a um nível de 95% ( $p < ,05$ ) se comparado ao controle negativo.

Nos tempos de 48 e 72 horas quase todas as concentrações (1, 5, 15, 20, 60, 80 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram efeito citotóxico/antitumoral, apresentando absorvâncias significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que a do controle negativo. Pode-se observar ainda que no tempo de 72 horas todas estas concentrações apresentaram viabilidades celulares menores que 80% (1  $\mu\text{g/mL}$  = 68,02%, 5  $\mu\text{g/mL}$  = 69,75%, 15  $\mu\text{g/mL}$  = 75,20%, 20  $\mu\text{g/mL}$  = 69,00%, 60  $\mu\text{g/mL}$  = 79,22%, 80  $\mu\text{g/mL}$  = 71,36% e 100  $\mu\text{g/mL}$  = 73,65%).

Alguns estudos têm demonstrado efeitos favoráveis da utilização de GAGs como agente citotóxico às células cancerígenas (KNELSON et al., 2014). Um estudo *in vitro* relatou atividade antiproliferativa positiva de GAGs sulfatados extraídos da lagosta da Noruega (*Neprops norvegicus*) contra células de carcinoma do cólon humano (SAYARI et al., 2016). Outro estudo com camundongos *in vivo* mostrou o potencial inibitório do sulfato de condroitina – E (SCE) extraído de Lula, pré-administrado em células de osteossarcoma capazes de formar tumores no fígado (BASAPPA et al., 2009). Isto se deve possivelmente ao fato de os GAGs serem os principais componentes da matriz extracelular e mudanças

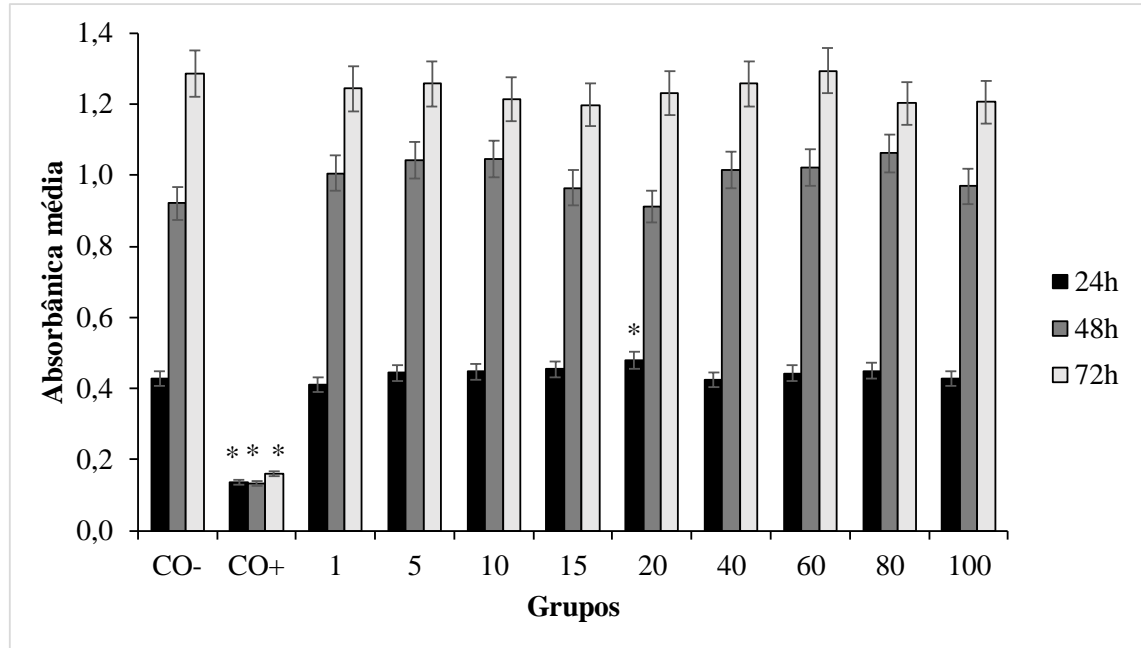
estruturais, de biossíntese e degradação de enzimas parecem estar envolvidas na progressão do câncer (AFRATIS et al., 2012).

**Tabela 3- Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado de rato, tratadas com a F - V, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT**

Grupos	Célula Tumoral Hepática de Ratos		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	47,73	25,77	27,44
1	94,08	57,26	68,02
5	118,14	81,38	69,75
10	83,60	98,27	98,54
15	107,23	80,65	75,20
20	99,04	81,91	69,00
40	103,13	85,76	88,43
60	91,84	79,22	73,16
80	78,20	71,36	75,04
100	81,25	73,65	81,52

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Os resultados da Figura 16 apresentam as absorvâncias médias obtidas para as células de neuroblastoma humano tratadas com a F - V. A análise estatística dos dados mostra que nenhuma das concentrações (1-100 µg/mL) apresentou efeito citotóxico para as células tumorais não metabolizadoras utilizadas no presente estudo. Pois apresentaram absorvâncias médias semelhantes ( $p < 0,05$ ) à absorvância média do controle negativo, em todos os tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas).



**Figura 16 - Absorbâncias médias de células de neuroblastoma humano tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F - V ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por 24, 48 e 72 horas**

\* Resultado estatisticamente significativo a um nível de 95% ( $p < 0,05$ ) se comparado ao controle negativo.

Observa-se na tabela 4 que todas as viabilidades celulares foram maiores que 80%. Somente a concentração de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no tempo de 24 horas, apresentou resultado significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente do controle negativo, neste caso, aumentando a proliferação celular, com viabilidade celular de cerca de 112%. Entretanto, este efeito indutor das divisões celulares não se manteve nos tempos de 48 e 72 horas. Os dados mostram que possivelmente devido às características das células de neuroblastoma, sua maior resistência ou ausência de metabolização, levaram a não citotoxicidade da amostra testada frente as células de neuroblastoma humano.

**Tabela 4- Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de neuroblastoma humano, tratadas com a F - V, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT**

Grupos	Célula Neuroblastoma Humano		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	31,75	14,39	12,47
1	95,91	109,17	96,69
5	104,09	113,06	97,78
10	104,62	113,57	94,38
15	106,26	104,75	93,19
20	112,11	99,02	95,72
40	99,24	110,07	97,80
60	103,68	110,97	100,66
80	105,03	115,36	93,52
100	100,12	105,16	93,84

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.

Assim, os dados demonstram o potencial da amostra testada, com atividade biológica de citotoxicidade frente células metabolizadoras, que possivelmente transformaram a amostra em compostos mais tóxicos para as células. Dos materiais estudados com potencial atividade antitumoral, os polissacarídeos podem superar inúmeras limitações de drogas já utilizadas com propriedades anticancerígenas. Podendo ser obtidos de fontes naturais, podem sofrer modificações químicas, apresentam baixa toxicidade, imunogenicidade às células normais, facilidade em atravessar membranas celulares e baixa degradação em fluídos biológicos (SINGH et al., 2019).



## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados obtidos indicam a presença de GAGs nas escamas de tilápia;
- ✓ O processo de extração utilizando a enzima papaína promoveu um rendimento bruto de 0,86% de GAGs;
- ✓ Sulfato de condroitina 4 (SC4) e sulfato de condroitina 6 (SC6) foram identificados na amostra;
- ✓ Verificou-se que na F - V existem em média 0,146 grupos sulfato por unidade monomérica;
- ✓ A mistura de sulfatos de condroitina apresentou atividade anticoagulante, principalmente em concentrações mais elevadas;
- ✓ Em presença de protamina, a amostra apresentou efeito pró-anticoagulante
- ✓ A amostra apresentou atividade citotóxica/antitumoral;
- ✓ Escamas de tilápia, subprodutos da indústria de pescados, podem ser uma fonte para extração de sulfato de condroitina (SC).

## REFERÊNCIAS

- ACEB, 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura, 2014. Disponível em: <[http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520\\_218117.pdf](http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- AFRATIS, N. et al. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1177–1197, Apr, 2012.
- AINLE, F. N.; et al., Protamine sulfate down-regulates thrombin generation by inhibiting factor V activation. **Blood**, v. 114, n. 8, 1658-1665, 2009.
- ANDRADE, G.P.V. et al. A heparin-like compound isolated from a marine crab rich in glucuronic acid 2-O-sulfate presents low anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n.1, p.647–654, 2013.
- ARIMA, K. et al. Amounts and compositional analysis of glycosaminoglycans in the tissue of fish. **Carbohydrate Research**, v. 366, p. 25-32, 2013.
- ARRUDA, L.F.; BORGHESI, R.; OETTEBER, M. Use of fish waste as silage – a review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.5, p. 879-886, 2007.
- BARDDAL, H.P.O.; GRACHER, A.H.; SIMAS-TOSIN, F.F.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after chemical sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 80, p. 328-333, 2015.
- BARDDAL, H.P.O.; FARIA, F.A.M.; NOGUEIRA, A.V.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 604-610, 2020.
- BASAPPA, M. S. et al. Involvement of chondroitin sulfate E in the liver tumor focal formation of murine osteosarcoma cells. **Glycobiology**, v.19, n. 7, p. 735–742. Jul. 2009.
- BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 330-334, 1962.
- BORDIGNON, A. C. **Caracterização da pele e da gelatina extraída de peles congeladas e salgadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 114 f. Dissertação de Mestrado

(Programa de Pós-Graduação em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2010.

BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A. A.; COLDEBELLA, A.; BUENO, G. B.; FEIDEN, A. Rações orgânicas suplementadas com farinha de resíduos de peixe para juvenis da tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41, n. 4, p. 686-692, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : MAPA, 140 p., 2017.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília, 60 p., 2011.

BRITO, A.S. et al. A non-hemorrhagic hybrid heparin/heparan sulfate with anticoagulant potential. **Carbohydrate Polymers**. v. 99, p. 372–378, 2014.

CARDOSO, L.E.; ERLICH, R. B.; RUDGE, M. C.; PECAROLI, J. C.; MOURÃO, P. A. **A comparative analysis of glycosaminoglycans from human umbilical arteries in normal subjects and in pathological conditions affective pregnancy**. Laboratory Investigation, New York, v.67, n.5, p.588-595, 1992.

CARLSSON, P.; KJELLÉN, L. Heparin Biosynthesis. In: LEVER, R.; MULLOY, B.; PAGE, C. P. **Heparin – A Century of Progress**, Springer, 2012, p. 23-42.

CHAGURI, M. P. **Utilização de escamas e *Eichhornia crassipes* no tratamento de efluentes de curtume de peles de tilápia**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal.

CHON, B. F.; BLANK, L. **Metabolic engineering of hyaluronic acid production**. The department of chemical engineerinf, university of Queensland, St. Lucia, Australia, 1998.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

CÔRTEZ, G. K.R. **Membranas à base de escama de peixe/quitosana – preparação caracterização e estudo da interação/liberação de tetraciclina edoxociclina**. 2014. 140 f. Doutorado (Engenharia de Materiais) Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

DA ROSA, S.C.; HOELZEL, C.S.; VIEIRA, B.V.; BARRETO, M.P.; BEIRÃO, H.L. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**, v. 38, n.9, p. 2593-2598, 2008.

DAHLBACK, B. **Blood coagulation**. *Lancet*, v. 355, p. 1627-1632, 2000.

DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **Journal of Biological Chemistry**, Maryland, v.167, n.1, p.189-198, 1946.

DIETERICH, F. et al. Development and characterization of protein hydrolysates originated from animal agro industrial byproducts. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 1, p. 12-19, 2014.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, p. 645–647, 1976.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106-110, 1962.

DORE, C. M. P. G., et al., A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and antiinflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 467-475, 2013.

DRUPY, R.A.; WALLINGTON, E.A. **Carleton's Histological Technique**, 5th ed. Oxford University Press, 1980.

FAO, 2012. **Fisheries and Aquaculture Department food and agriculture organization of the united nations**. Fisheries Department. Roma, p. 230, 2012.

FAO, 2019. **Fisheries and Aquaculture**. Social and economic performance of tilapia farming in Brazil. Fisheries and Aquaculture Department. Roma, p. 56, 2019.

FAO, 2020. **FAO Aquaculture Newsletter**. Roma, n. 61, p.60, 2020.

FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 883, n. 02, p. 173-177, 1986.

FELTES, M. M. C., et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, p.669-677, 2010.

FERNANDES JÚNIOR, F.; KANO, C.; AZEVEDO FILHO, J.A. de.; DONADELLI, A. **Efeito de fertilizante orgânico oriundo de restos de pescado fresco fermentado, em batata produzida em sistema orgânico**. Horticultura Brasileira, v. 27, n. 2, p.184-188, 2009.

FITZSIMMONS, K. **Panorama do mercado mundial da tilápia**. Revista Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro, v.19, n. 111, p.54-55, 2009.

FLENGSRUD, R.; LARSEN, M. L., ODEGAARD, O. R. Purification, characterization and *in vivo* studies of salmon heparin. **Thrombosis Research**, v. 126, p. 409-417, 2010.

FRANCO, M. L. R. S. Transformação da pele do peixe em couro. In: GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, p. 407-425, 2011.

GANDRA, M., CAVALCANTE, M.C., PAVÃO, M.S. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicata). **Glycobiology**, v. 10, n. 12, p. 1333–1340, 2000.

GODOY, L. C.; et al. Análise sensorial de caldos e canjas elaborados com farinha de carcaças de peixe defumadas: aplicação na merenda escolar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 30, p. 86-89, 2010.

GOMES, A.M. et al. Unique extracellular matrix heparan sulfate from the bivalve *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) safely inhibits arterial thrombosis after photochemically induced endothelial lesion. **Journal Biological Chemistry**, v.285, n. 10, p. 7312–7323, 2010.

GONÇALVES, L. U.; FERROLI, F.; VIEGAS, E. M. M. Effect of the inclusion of fish residue oils in diets on the fatty acid profile of muscles of males and females lambari (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 9, p. 1967-1974, 2012.

GUI, M.; SONG, J.; ZHANG, L.; WANG, S.; WU, R.; MA, C.; LI, P. Chemical characteristics and antithrombotic effect of chondroitin sulfates from sturgeon skull and sturgeon backbone. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 454-460, 2015.

GULATI, K., POLURI, K.M. Mechanistic and therapeutic overview of glycosaminoglycans: the unsung heroes of biomolecular signaling. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, n.1, p. 1–17, 2016.

HAMER, G.K.; PERLIN, A.S.; A  $^{13}\text{C}$ -N.M.R spectral study of chondroitin sulfates A, B, and C: evidence of heterogeneity. **Carbohydrate Research**, v. 49, p. 37 – 48, 1976.

HASIHM, P.; MOHD RIDZWINA, M. S.; BAKAR, J. e MAT HASHIM, D. Collagen in food and beverage industries. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 1, p. 1 – 8, 2015.

HIGASHI, K. et al. Functional chondroitin sulfate from *Enteroctopus dofleini* containing a 3-O-sulfoglucuronic acid residue. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 557–565, 2015.

HILEMAN, R.E; FROMM, J.R.; WEILER, J.M.; LINHARDT, R.J. Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. **BioEssays**, v.20, n. 2, p. 156–167, 1998.

HU, L. et al., Effects of fish meal quality and fish meal substitution by animal protein blend on growth performance, flesh quality and liver histology of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Aquaculture**, v. 372-375, p. 52-61, 2013.

HUCKERBY, T. N.; et al.; Characterization of oligosaccharides from the chondroitinsulfates  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR studies of reduced disaccharides and tetrasaccharides. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p.1181 - 1189, 2001.

KATO, D. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. **Antiviral Research**, v. 88, n. 2, p. 236–243, 2010.

KIM, J. et al. Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 440-445, 1996.

KNELSON, E.H.; NEE, J.C.; BLOBE, G.C. Heparan sulfate signaling in cancer. **Trends in Biochemical Science**, v. 39, n. 6, p. 277–288, 2014.

KRICHEN F., et al. Isolation, purification and structural characteristics of chondroitin sulfate from smooth hound cartilage: In vitro anticoagulant and antiproliferative properties, **Carbohydrate Polymers**, v.197, p. 451-459, 2018

KRYLOV, V.B. Preliminary structural characterization, anti-inflammatory and anticoagulant activities of chondroitin sulfates from marine fish cartilage. **Russian Chemical Bulletin**, v.60, n. 4, p. 746, 2011.

KUMAR, M.H.; SPANDANA, V.; POONAM, T. Extraction and determination of collagen peptide and its clinical importance from tilapia fish scales (*Oreochromis niloticus*). **International Research Journal of Pharmacy**, v.2, n. 10, p. 92-97, 2011.

LAMARI, F. N.; KARAMANOS, N. K. Structure of Chondroitin Sulfate. In: VOLPI, N. (Ed.). Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity. **Advances in Pharmacology, Elsevier**, v. 53, p. 1-568, 2006.

LAURICELLA, A.M., CASTANON, M.M., KORDICH, L.C., QUINTANA, I.L. Alterations of fibrin network structure mediated by dermatan sulfate. **Journal Thrombosis and Thrombolysis**, v.35, p. 257–263,2013.

LIANG, W.; MAO, X.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharide anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 776-785, 2014.

LYCZKOA, N.; NZIHOUA, A.; SHARROKA, P. Calcium phosphate sorbent for environmental application. **Procedia Engineering**, v. 83, p. 423 – 431, 2014.

LÓPEZ-MOSQUERA, M. E et al. Composting fish waste and seaweed to produce a fertilizer for use in organic agriculture. **Procedia Environmental Science**, v. 9, p. 113–117, 2011.

LU, X.; MO, X.; GUO, H.; ZHANG, Y. Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruits. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1189-1195, 2012.

MAAS, N. C.; GRACHER, A. H. P.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Sulfation pattern of citrus pectin and its carboxy-reduced derivatives: Influence on anticoagulant and antithrombotic effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1081-1087, 2012.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M. Coagulação sanguínea e anticoagulantes, trombóticos e fármacos antiplaquetários. In: GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1321-1341.

MAIMONE, M. M.; TOLLEFSEN, D. M. Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 265, p. 18263-18271, 1990.

MALUF, M. L. F.; HILBIG, C. C. Curtimento ecológico de peles de animais para agregação de valor através da confecção de artesanato. **Revista Varia Scientia**, v. 9, n. 15, p. 75-79, 2010.

MEDEIROS, G.F. et al. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochimica et Biophysica Acta– General Subjects**, v. 1475, n. 3, p. 287–294, 2000.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOU, J.; WANG, C.; LI, W.; YANG, J. Purification, structural characterization and anticoagulant properties of fucosylated chondroitin sulfate isolated from *Holothuria mexicana*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 208-215, 2017.

MOUSAVI, S.; MORADI, M.; KHORSHIDAHMAD, T.; MOTAMEDI, M. Anti-inflammatory effects of heparin and its derivatives: a systematic review. **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**, v.2015, p. 1-14, 2015.

MUCCI, A.; SCHENETTI, L.; VOLPI, N.; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance identification and characterization of components of chondroitin sulfates of various origin. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 37 - 45, 2000.

MUZZARELLI, R. A.; GRECO, F.; BUSILACCHI, A.; SOLLAZZO, V.; GIGANTE, A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 3, p. 723–739, 2012.

NAKANO, T., BETTI, M., PIETRASIK, Z. Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 2, p. 61-74, 2010.

NAKANO, T.; OZIMEK, L.; BETTI, M. Immunological detection of keratan sulfate in meat products with and without mechanically separated chicken meat. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 867–869, 2012.



NOGUEIRA, A. V. et al. Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoclycans of pharmacological interest. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 239-248, 2019.

NUNES, M. L. C. **Farinha de pescado**. In: GONÇALVES, A. A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, p. 608, 2011.

ODUAH, E., LINHARDT, R., SHARFSTEIN, S. Heparin: past, present, and future. **Pharmaceuticals**, v.9, n. 3, p. 38, 2016.

OKUDA, M.; TAKEGUCHI, M.; TAGAYA, M. *et al.* Elemental distribution analysis of type I collagen fibrils in tilapia fish scale with energy-filtered transmission electron microscope. **Micron**, v.40, n. 5-6, p.665-668, 2009.

OLIVEIRA, C. R. C. et al. **Composição físico química e valores energéticos de farinhas de silagem de peixe para frangos de corte**. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 66, n. 3, p. 933-939, 2014.

OSBORNE, S.A.; DANIEL, R.A.; DESILVA, K.; SEYMOUR, R.B. Antithrombin activity and disaccharide composition of dermatan sulfate from different bovine tissues. **Glycobiology**, v. 18, p. 225–234, 2008.

PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher stability. **Bioresource Technology**, v.101, p. 3737-3742, 2010.

PEIXE BR Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário da Piscicultura 2019**, 2019. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019/>> Acesso em: 01 mai. 2020.

PEIXE BR Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário da Piscicultura 2020**, 2020. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/anuario-2020/>> Acesso em: 01 mai. 2020.

PERKIN, W.H. On mauveine and allied colouring matters. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 35, p. 717-732, 1879.

PHARMA, L., 2012. **Green Accounts**, Esbjerg. p. 2012.

PLACE, E.S.; EVANS, N.D.; STEVENS, M.M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature Materials**.v.8, n. 6.p. 457–470, 2009.

POMIN, V.H., 2014. Holothurian fucosylated chondroitin sulfate. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 232–254, 2014.

PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Óleo de Pescado. In: GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo. p.608. 2011.

PURUSHOTHAMAN, A., SUGAHARA, K., FAISSNER, A. Chondroitin sulfate “Wobble Motifs” modulate maintenance and differentiation of neural stem cells and their progeny. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n.5, p. 2935–2942, 2012.

REBOUÇAS, M. C; RODRIGUES, M. C. P; CASTRO, R. J. S; VIEIRA, J. M. M. Caracterização do concentrado proteico de peixe obtido a partir dos resíduos da filetagem da tilápia do Nilo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.2, p.697-704, 2012.

ROSA, M. J. S. **Aproveitamento integral dos resíduos da filetagem de tilápia e avaliação do impacto**. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

ROTH, M.; PAPAKONSTANTINO, E.; KARAKIULAKIS, G. Biological function of glycosaminoglycans. In: Garg, H. G.; Cowman, M. K.; Hales, C. A. **Carbohydrate chemistry, biology and medical applications**. Elsevier, 2008, p. 209-226.

RUDD, T, R. et al. Glycosaminoglycan origin and structure revealed by multivariate analysis of NMR and CD spectra. **Glycobiology**, v. 19, p. 52-67, 2009.

SAYARI, N. et al. Anticoagulant properties and cytotoxic effect against HCT116 human colon cell line of sulfated glycosaminoglycans isolated from the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) shell. **Biomed Pharmacother**, v.80, p. 322–330, 2016

SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Emergence and structural characteristics of chondroitin sulfates in the animal kingdom. **Advances in Pharmacology**, v. 53, n. 05, p. 233–251, 2006.

SANTOS, J.C. et al. Isolation and characterization of a heparin with low antithrombin activity from the body of *Styelaplicata* (Chordata-Tunicata). Distinct effects on venous and arterial models of thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 121, n. 2, p. 213–223, 2007.

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A.A. Toluidine blue: a review of its chemistry and clinical utility. **Journal Oral Maxillofacial Pathology**, v.16, p. 251–255, 2012.

SHUHEI, Y.; KAZUYUKI, S. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 5, n. 4, p. 289–301, 2008.

SEKAR, K. S.; KATHEEM, M. F.; KRISHNAKUMAR, S.; SASTRY, T.P. Fish scale collagen - A novel material for corneal tissue engineering. **Artificial Organs**, v. 36, n. 9, p. 829-835, 2012.

SERRANO, M.C. et al. Chondroitin sulphate-based 3D scaffolds containing MWCNTs for nervous tissue repair. **Biomaterials**, v. 35, n. 5, p.1543–1551, 2014.

SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PETRY, F. C.; PINTO, L. A. A. Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 5, p. 904-909, 2011.

SINGH, A.K.; BHADAURIA, A.S.; KUMAR, P.; BERA, H.; SAHA, S. Bioactive and drug-delivery potentials of polysaccharides and their derivatives. **Polysaccharide Carriers for Drug Delivery**, p. 19-49, 2019.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ALVAREZ, E.J.S.; BRAGA, F.M.S. Water quality and zooplankton in tanks with larvae of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1949). **Brazilian Journal Biology**, v.68, n. 1, p. 77-86, 2008.

SOARES DA COSTA, D.; REIS, R.L.; PASHKULEVA, I. Sulfation of glycosaminoglycans and its implications in human health and disorders. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 19, p. 1-26, 2017.

STONE, J.E. Urine analysis in the diagnosis of mucopolysaccharide disorders, **Annals of Clinical Biochemistry**, v.35, p. 207–225, 1998.

SUGAHARA, K.; MIKAMI, T. Chondroitin/dermatan sulfate in the central nervous system. **Current Opinion Structural Biology**, v. 17, n. 5, p. 536–545, 2007.

SUCASAS, L. F. A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade da cadeia produtiva**. 2011. 166 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo.

TASKAYA, L.; JACZYNSKI, J. Flocculation-enhanced protein recovery from fish processing by-products by isoelectric solubilization/precipitation. **LWT- Food Science Technology**, v.42, n. 2, p. 570-575, 2009.

TEMPLETON, D.M. The basis and applicability of the dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans. **Connective Tissue Research**, v.17, n.1, p.23-32, 1988.

THODESEN, J.; RYE, M.; WANG, Y. X.; BENTSEN, H. B.; GJEDREM, T. Genetic improvement of tilapias in China: Genetic parameters and selection responses in fillet traits of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after six generations of multi-trait selection for growth and fillet yield. **Aquaculture**, v. 366–367, p. 67–75, 2012.

TINGBO, M. G. et al. Type of carbohydrate in feed affects the expression of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) glycosaminoglycans (GAGs) and interleukins in skeletal muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*L.). **Fish e Shellfish Immunology**, v. 32, p. 582-589, 2012.

TORRI, G., GUERRINI, M. Quantitative 2D NMR analysis of glycosaminoglycans. In: HOLZGRABE, U., WAWER, I., DIEHL, B. NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis. **Elsevier**, p.407-428, 2008.

UNGER, S. et al. Phenotypic features of carbohydrate sulfotransferase 3 (CHST3) deficiency in 24 patients: congenital dislocations and vertebral changes as principal diagnostic features. **American Journal of Medical Genetics**, v.152, n. 10, p. 2543–2549, 2010.

**VIDOTTI, R. M. Silagem de pescado. In: GONÇALVES, A. A. Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação. São Paulo: Atheneu, p. 399-406, 2011.**

VIDOTTI, R. M. **Tecnologias para o aproveitamento integral de peixes.** Macapá: Curso Técnica de Manejo em Piscicultura Intensiva, ed. 1, p. 01-22, 2011.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G. S.; MARTINS, M. I. E. G. **Farinha e óleo de resíduos de Tilápia: informações técnica e econômica.** Jaboticabal: Funep, p. 24, 2011.

VIVIAN, M. M. P. S. **Caracterização e perspectivas de utilização de escamas da tilápia do Nilo.** 2013. 60f. Mestrado (Zootecnia). Universidade Estadual do Paraná, Marechal Cândido do Rondon.

VOLPI, N. Analytical Aspects of Pharmaceutical Grade Chondroitin Sulfates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 12, p. 3168-3180, 2007.

VOLPI N. Therapeutic applications of glycosaminoglycans. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1799-1810, 2006.

VOLPI, N.; MACCARI, F. Detection of submicrogram quantities of glycosaminoglycans on agarose gels by sequential staining with toluidine blue and stains-all. **Electrophoresis** v. 23, p. 4060–4066, 2002.

VOLPI, N.; MACCARI, F. Structural characterization and antithrombin activity of dermatan sulfate purified from marine clam *Scapharca inaequivalvis*. **Glycobiology**, v. 19, p. 356–367, 2009.

XU, H.; YAN, Y.; LI, S. PDLLA/chondroitin sulfate/chitosan/NGF conduits for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 20, p. 4506–4516, 2011.

WELTI, D.; REES, D.A.; WELSH, J.; Solution conformation of glycosaminoglycans: Assignment of the 300-MHz sulfates<sup>1</sup>H- magnetic resonance spectra of chondroitin 4-sulphate, chondroitin 6-sulphate and hyaluronate, and investigation of an alkali-induced conformation change. **European Journal Biochemistry**, v. 94, p. 505 – 514, 1979.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v. 4, p. 297-298, 1964.

YAJIMA, E. M.; FRANCO, M. L. R. S.; BORDIGNON, A. C. Produção de gelatina de Pescado. In: GONÇALVES, A. A. **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo: Atheneu, p. 426-434, 2011.