



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA

FRANCISCA GENY MARFIM FERNANDES

**TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COMO FONTE DE RESÍDUOS PARA
EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS ANTIOXIDANTES**

FORTALEZA

2022

FRANCISCA GENY MARFIM FERNANDES

TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COMO FONTE DE RESÍDUOS PARA
EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS ANTIOXIDANTES

Monografia apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Orientadora: Profa. Dra. Ianna Wivianne
Fernandes de Araújo.

FORTALEZA
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F399t Fernandes, Francisca Geny Marfim.
Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como fonte de resíduos para extração de glicosaminoglicanos antioxidantes / Francisca Geny Marfim Fernandes. – 2022.
73 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.
Orientação: Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo.

1. Tilápia do Nilo. 2. Resíduos orgânicos. 3. Glicanos. 4. Potencial redutor. I. Título.

CDD 639.2

FRANCISCA GENY MARFIM FERNANDES

TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) COMO FONTE DE RESÍDUOS PARA
EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS ANTIOXIDANTES

Monografia apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. José Ariévilto Gurgel Rodrigues
Engenheiro de Pesca/Membro externo (Orientador Técnico)

Profa. Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AO ETERNO D'US.
À Áurea Marfim.
A Levy Marfim.

AGRADECIMENTOS

À minha Família pelo apoio incondicional, pelo incentivo a novas conquistas, pelas condições para ir além e pelo amor incomparável.

À Prof^a. Dr^a. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo, pela orientação, pelo acolhimento no laboratório e pelas oportunidades que daí surgiram.

Ao Dr. José Ariévilo Gurgel Rodrigues, pela orientação técnica-científica e pela condução das atividades experimentais, sem as quais impossível seria a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante, por todo suporte oferecido e pela valiosíssima colaboração neste trabalho além da correção e das sugestões.

Ao Prof^o. Dr. Oscar Pacheco Passos Neto que, gentilmente, cedeu os peixes utilizados nesta pesquisa e pelas sugestões apresentadas.

Ao Dr. Ismael Nilo Lino de Queiroz pela realização e orientação das eletroforeses em poliacrilamida.

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Ponte Freitas, ao Francisco Diego da Silva Chagas e ao José Gabriel de Sousa Cândido do Laboratório de Algas Marinhas/Dep. Bioquímica/UFC pela realização dos ensaios antioxidantes, importantíssimos para esta pesquisa.

Ao técnico Johnny Peter Macedo Feitosa do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais e Compósitos/Dep. Química Orgânica e Inorgânica/UFC pela realização dos espectros de infravermelho desta pesquisa.

Ao Antônio Carlos Nunes de Lima, pelo companheirismo, ajuda e estímulo nos trabalhos do laboratório – BIOMAR/CEBIAQUA.

À FUNCAP e ao PIBIC/UFC pelo apoio financeiro por meio de bolsas durante a graduação.

“A glória é tanto mais tardia quanto mais duradoura há de ser, porque todo fruto delicioso amadurece lentamente.”
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Dentre as possibilidades de aproveitamento dos resíduos da filetagem da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) está a extração de glicosaminoglicanos (GAGs) antioxidantes frente aos sintéticos indutores de câncer. Este trabalho avaliou a distribuição, as características moleculares e a capacidade antioxidante *in vitro* de GAGs obtidos de pele, brânquia, olho, intestino e gônada de exemplares cultivados na Estação de Aquicultura/UFC. Os resíduos desidratados e quantificados foram digeridos com papaína e seus GAGs caracterizados por rendimento, metacromasia usando azul dimetilmetileno como indicador, eletroforeses em géis de agarose e poliacrilamida comparando-se à heparina, condroitim-4/-6-sulfato, dermatam sulfato e/ou dextrana sulfatada visualizados com azul de toluidina ou “stains all”, espectroscopia de infravermelho e capacidade antioxidante *in vitro* pelos ensaios de sequestro do radical DPPH, quelação do íon ferroso e capacidade antioxidante total tomando-se BHT, EDTA e ácido ascórbico como padrões, respectivamente. Resultados mostraram um volume maior de resíduos desidratados da anatomia externa (1,56%) em relação aos da cavidade abdominal (0,11%). Brânquia – arco e base ($1,28 \pm 0,06\%$ e $0,46 \pm 0,07\%$, respectivamente) foi a fonte principal em GAGs, seguida de gônada ($0,40 \pm 0,08\%$), intestino ($0,36 \pm 0,10\%$), pele ($0,18 \pm 0,02\%$) e olho ($0,16 \pm 0,03\%$). Técnicas bioquímicas e estruturais utilizadas sugeriram GAGs com distribuição e composição complexas e heterogêneas, metacromáticos (sulfatação) e com, aproximadamente, 40 kDa de peso molecular considerando-se todas as amostras avaliadas, cujos perfis indicaram em brânquia condroitim-6/-4-sulfato; em pele, condroitim/dermatam; em olho, dermatam e ácido hialurônico; em intestino, heparam mais expressivo que dermatam, além de ácido hialurônico e em gônada, condroitim-6/-4-sulfato, heparam e/ou ácido hialurônico. Ensaio avaliativos da atividade antioxidante *in vitro* dos GAGs constituintes da base branquial mostraram que estes possuem consideráveis efeitos sobre o sequestro do radical DPPH e na quelação do íon ferroso, com inibições tão potentes quanto ao controle BHT e EDTA, respectivamente, sugerindo ação coadjuvante no combate ao estresse oxidativo. Portanto, a Tilápia do Nilo possui distribuição e bioquímica complexa de GAGs e o resíduo da base branquial revelou estes como potentes agentes antioxidantes *in vitro*.

Palavras-chave: Tilápia do Nilo; resíduos orgânicos; glicanos; potencial redutor.

ABSTRACT

Within the possibilities of the use of residues from Nile Tilapia filleting (*Oreochromis niloticus*) is the extraction of glycosaminoglycans (GAGs) antioxidant as an alternative option to cancer-inducing synthetics. This work had evaluated the distribution, the molecule characteristics, and the *in vitro* antioxidant capacity of the GAGs obtained by the skin, gill, eye, intestine and gonad of specimens cultivated at the Aquaculture Station/UFC. The dehydrated and quantified residues were digested with papain and its GAGs characterized by yield, metachromasia using dimethylmethylene blue as indicator, electrophoresis in agarose and polyacrylamide gels comparing to heparin, chondroitin-4/6-sulfate, dermatan sulfate and/or sulfated dextran visualized with toluidine blue or stains all, infrared spectroscopy, and *in vitro* antioxidant capacity of scavenging the radical DPPH, chelation of the ferrous ion, and total antioxidant capacity taking BHT, EDTA, and Ascorbic acid as standards, respectively. The results showed a larger volume of dehydrated residues of the external anatomy (1.56%) in relation to the abdominal cavity (0.11%). Gill – arc and basis ($1.28 \pm 0.06\%$ and 0.46 ± 0.07 , respectively) it was the main source in GAGs, followed by gonad ($0.40 \pm 0.08\%$), intestine ($0.36 \pm 0.10\%$), skin ($0.18 \pm 0.02\%$) and eye ($0.16 \pm 0.03\%$). Biochemistry and structural techniques used suggested GAGs with distribution, complex and heterogenous composition, metachromatics (sulfation) and with approximately 40 kDa of molecule weigh considering all evaluated samples, whose profiles had indicated in gill chondroitin-4/6-sulfate; in skin, chondroitin/dermatan; in eye, dermatan and hyaluronic acid; in intestine, heparan more expressive than dermatan, besides hyaluronic acid and in gonad, chondroitin-4/6-sulfate, heparan and/or hyaluronic acid. Evaluative tests of *in vitro* antioxidant activity of the gill basis constituents GAGs showed that these possess considerable effects over the scavenging of the radical DPPH and in the chelation of the ferrous ion, with inhibitions as powerful as the used control BHT and EDTA, respectively, suggesting parental action in the combat of the oxidative stress. Therefore, the Nile Tilapia possesses distribution and complex biochemistry of GAGs and the residue of the gill basis reveals them as powerful *in vitro* antioxidants agents.

Keywords: Nile Tilapia; organic residues; glycans; reducing potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia e histologia da pele de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	20
Figura 2 – Morfologia da brânquia de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	22
Figura 3 – Morfologia do olho de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	24
Figura 4 – Seção vertical diagramática através do olho de peixes	25
Figura 5 – Morfologia do intestino de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	27
Figura 6 – Morfologia das gônadas de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	28
Figura 7 – Estruturas químicas dos principais GAGs	31
Figura 8 – Exemplar de Tilápia do Nilo despescado e abatido procedente da Estação de Aquicultura do DEP/CCA/UFC	35
Figura 9 – Resíduos desidratados de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	36
Figura 10 – Fluxograma de extração de GAGs dos resíduos de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	37
Figura 11 – Metacromasia dos GAGs brutos, por resíduos, de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	46
Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose (0,5%) dos GAGs, por resíduos, de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	47
Figura 13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) dos GAGs, por resíduo, de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	49
Figura 14 – Espectros de infravermelho dos GAGs, por resíduos, obtidos de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) em 4000 – 500 cm ⁻¹	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Rendimentos (%) de massa desidratada, por resíduo, de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	42
Gráfico 2 – Rendimentos (%) dos GAGs brutos extraídos dos diferentes resíduos de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	43
Gráfico 3 – Sequestro do radical DPPH (%), <i>in vitro</i> , dos GAGs obtidos da base branquial de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	57
Gráfico 4 – Quelação do íon ferroso (%), <i>in vitro</i> , dos GAGs obtidos da base branquial de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis Niloticus</i>)	59
Gráfico 5 – Capacidade antioxidante total (%), <i>in vitro</i> , dos GAGs obtidos da base branquial de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação do rendimento (%) de GAGs, por resíduo, de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) com outras fontes animais	44
Tabela 2 – Sinais de IV presumidos para GAGs brutos extraídos de diferentes resíduos removidos de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
aB	Arco branquial
AH	Ácido hialurônico
bB	Base branquial
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
°C	Grau Celsius
CEBIAQUA	Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Número de onda
CS	Condroitim sulfato
Cu ⁺²	Íon cúprico
DMB	1,9 dimetilmetileno azul
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1 difenil-2-picrilhidrazil
DS	Dermatam sulfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
Fe ⁺²	Íon ferroso
g	grama
GAG	Glicosaminoglicano
G	Gônada
h	Hora
HEP	Heparina
HO ⁻	Radical hidroxila
HS	Heparam sulfato
I	Intestino

IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
M	Molar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Micrograma
nm	Nanômetro
O	Olho
P	Pele
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
QS	Queratan sulfato
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
UFC	Universidade Federal do Ceará
V	Volt

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Produção atual de pescado	16
1.2	Produção de Tilápias no Brasil.....	17
1.3	Geração de resíduos no processo de filetagem da Tilápia	18
1.4	Estruturas de alguns órgãos principais de peixes	19
1.4.1	<i>Pele</i>	19
1.4.2	<i>Brânquia</i>	21
1.4.3	<i>Olho</i>	23
1.4.4	<i>Intestino</i>	26
1.4.5	<i>Gônada</i>	28
1.5	Glicosaminoglicanos: aspectos químicos e propriedade antioxidante	30
1.6	Prospecção de GAGs antioxidantes em resíduos de pescado	32
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	Obtenção, tratamento e determinação da massa desidratada da matéria-prima ...	34
2.2	Extração dos GAGs	37
2.3	Ensaio de metacromasia	38
2.4	Caracterização físico-química de GAGs por eletroforeses em gel de agarose e em gel de poliacrilamida	38
2.5	Análise estrutural dos GAGs por espectroscopia de infravermelho	39
2.6	Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	39
2.6.1	<i>Capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)</i>	39
2.6.2	<i>Habilidade de quelação do íon ferroso (FIC)</i>	40
2.6.3	<i>Capacidade antioxidante total</i>	40
2.7	Análises estatísticas	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1	Rendimento de resíduos obtidos de Tilápia	42
3.2	Rendimento de GAGs brutos nos diferentes resíduos de Tilápia	43
3.3	Análise metacromática preliminar de sulfatação	45
3.4	Caracterização físico-química dos GAGs	46

3.4.1	<i>Caracterização por eletroforese em gel de agarose</i>	46
3.4.2	<i>Caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida</i>	49
3.5	Análise espectral de IV dos GAGs de resíduos de Tilápia	51
3.6	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de GAGs de base branquial de Tilápia	56
3.6.1	<i>Sequestro do Radical DPPH</i>	57
3.6.2	<i>Quelação do íon ferroso</i>	58
3.6.3	<i>Capacidade antioxidante total</i>	60
4	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção atual de pescado

A produção de pescado no mundo em 2018 expôs um cenário no qual a pesca extrativa (captura) alcançou um índice recorde de 96,4 milhões de toneladas, dos quais 12 milhões de toneladas foram da pesca em águas interiores, enquanto a pesca marinha revelou níveis de 2004-2005, com 84,4 milhões de toneladas, ultrapassando a média dos anos 2010-2017 em que se registrou 79 milhões de toneladas. Deste total, a aquicultura contribuiu com uma produção de 82,1 milhões de toneladas, sendo 51,3 milhões em águas interiores e 30,8 milhões em águas marinhas. Nesta conjuntura, estima-se que a produção aquícola deva sobrepor a pesca em toneladas, com um crescimento previsto de 32% (26 milhões de toneladas) até 2030, enquanto a pesca deve se manter estável (FAO, 2020).

O cultivo de peixes vem assumindo importância cada vez maior no panorama do abastecimento alimentar (REBOUÇAS *et al.*, 2014), isto deve-se ao fato de que nas últimas décadas a produção mundial de pescado vem sendo impulsionada pelo aumento do crescimento populacional, urbanização, aumento da renda e pela expansão da produção de peixes e distribuição mais eficiente (VICENTE *et al.*, 2014). Nessas circunstâncias, a aquicultura apresenta-se como a alternativa mais viável para garantir a continuidade do aumento da oferta nos próximos anos, dado que a pesca se encontra com a produção estabilizada desde a década de 1990 (FAO, 2014b), com a produção de organismos aquáticos em cativeiro composta, principalmente, por pescado oriundo de águas interiores. Estima-se que o pescado represente 16,7% de toda a proteína animal consumida por humanos no planeta e 6,5% de toda a proteína, considerando as duas origens, animal e vegetal. Estes valores são superiores ao das carnes de suíno, frango, bovino, ovino e caprino, as mais consumidas na sequência (FAO, 2014a). A tendência, face a esse contexto, é que a aquicultura seja responsável por suprir a maior parte da demanda global por pescado nos próximos anos. Essa atividade vem crescendo mais rapidamente que qualquer outro segmento do setor agropecuário com média de 6,2% ao ano considerando entre 2000 e 2012 (FAO, 2014a; FAO, 2014b).

O Brasil, hoje, ocupa a 13ª posição na produção de peixes em cativeiro, e é o 8º na produção de peixes de água doce. Segundo a FAO, desde 2014 não há estatística pesqueira oficial no Brasil, esses dados são obtidos por levantamentos realizados pela instituição e seus parceiros (FAO, 2020).

1.2 Produção de Tilápia no Brasil

O pescado é fonte de proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos insaturados e vitaminas, apresenta baixo teor de colesterol, constituindo uma opção de consumo mais saudável do que as outras carnes (GONÇALVES, 2011). É considerado a fonte de proteína mais consumida no mundo (QUEIROZ, 2015), sendo a tilápia o segundo peixe mais cultivado no mundo e uma fonte sustentável de alimento (CONTE *et al.*, 2017).

No Brasil vêm ocorrendo um crescimento da população que consome organismos aquáticos e, conseqüentemente, necessitando de uma maior demanda por peixes (IGARASHI, 2018). A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus, 1758) é a espécie de maior importância comercial, representando 57% de todo pescado produzido no País de acordo com dados do Anuário Brasileiro da Piscicultura 2020, produzido pela Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR).

A Tilápia do Nilo, originária do delta do Rio Nilo (leste da África), foi introduzida no início da década de 1970 no Brasil, inicialmente para repovoamento de açudes da região Nordeste e, posteriormente, difundiu-se pelo País. Na década de 1990, o cultivo desse peixe exótico ganhou importância, principalmente nos estados das regiões Sul e Sudeste (DIAS, 2019). Atualmente, é um dos principais peixes cultivados em diferentes sistemas de produção intensiva, especialmente nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste (GONÇALVES; JERÔNIMO; MARTINS, 2009; FURUYA, 2011).

A produção nacional cresceu 4,9%, correspondendo a 758.006 toneladas, colocando o Brasil na posição de 4º maior produtor mundial de Tilápias (Peixe BR, 2020). É, atualmente, o peixe que apresenta maiores índices de produção na aquicultura nacional, em função de características relativas à rusticidade genética, reprodução e potencial mercadológico (BANDEIRA; NASCIMENTO, 2017). Das linhagens de Tilápias mais conhecidas, destacam-se a GIFT (Genetic Improved Farmed Tilapia) e a Chitralada (IGARASHI, 2018).

A produção de Tilápias no Brasil transformou algumas regiões do país em polos produtivos importantes, com crescente desenvolvimento e tendo elos de sua cadeia produtiva bem definidos, como o setor de insumos, sistemas produtivos, agroindústria, comercialização e mercado consumidor (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

A Tilápia tem sido uma das espécies de peixes de maior aceitação de mercado por apresentar ainda características atrativas, como carne branca de textura firme, sabor suave e ausência de espinhos em forma de “y”, tornando-a ótima para o processo de filetagem. Contudo, por ser extremamente precíval, o processo de industrialização agrega valor à matéria-prima,

ao tornar o produto com maior vida útil e com novas opções de consumo (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

No processo de filetagem, o rendimento é variável e fatores como a estrutura anatômica do corpo, tamanho da cabeça, porcentagem dos resíduos (vísceras, pele e nadadeiras), sexo e linhagem dos peixes determinam os valores de rendimento (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

1.3 Geração de resíduos no processo de filetagem da Tilápia

O principal objetivo da industrialização de Tilápias é a produção de filés e, durante o processamento, ocorre a geração de resíduos que representa entre 62,5% e 66,5% da matéria-prima, necessitando gerenciamento correto para evitar os impactos ambientais (BOSCOLO *et al.*, 2008). Estes resíduos são constituídos de vísceras, cabeças, carcaça, pele e escamas (VIDOTTI; GONÇALVES, 2006).

O crescimento da indústria do pescado resultou em quantidades crescentes de resíduos que podem representar até 70% do pescado processado conforme FAO (2020). São gerados em todas as etapas da cadeia produtiva e muitas vezes descartados de maneira inadequada produzindo impactos ambientais, excetuando-se quando a destinação ambiental é a compostagem orgânica.

Considerando-se o panorama mundial, os resíduos do processamento de pescado variam entre 18 e 30 milhões de toneladas (RAMÍREZ, 2007) e representam um potencial ainda subexplorado para o desenvolvimento de coprodutos, subprodutos e a agregação de valor (KUBITZA, 2006).

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).

Dentre as possibilidades geradas por esses resíduos orgânicos, já em franca exploração, estão os hidrolisados proteicos, a silagem, a farinha para consumo animal ou humano e o óleo para produção de suplementos nutricionais para humanos ou biocombustíveis (OLIVEIRA, *et al.*, 2006; WIGGERS *et al.*, 2009; WISNIEWSKI JUNIOR *et al.*, 2010).

Os resíduos do processamento de pescado apresentam alta qualidade nutricional e podem ser considerados fontes de proteínas, enzimas e lipídeos não aproveitados, possibilitando

o encaminhamento para outros fins como produção de suplementos proteicos (KADAM; PRABHASANKAR, 2010).

Outra possibilidade advinda dos resíduos da filetagem da Tilápia, descartados em grande quantidade pela indústria, é a extração de glicosaminoglicanos (GAGs). O uso de rejeitos da indústria do pescado, gerando subprodutos de valor biotecnológico, vem crescendo como fontes naturais inovadoras para a obtenção de GAGs (MOURA *et al.*, 2020). Essas macromoléculas, presentes no reino animal em todas as espécies que apresentam organização tecidual (MEDEIROS *et al.*, 2000), apresentam diversas aplicações, como caráter antioxidante permitindo avaliar seus potenciais biotecnológicos em sistemas ambientais, isolando-as a partir de diversas estruturas teciduais (JRIDI *et al.*, 2019; BAI *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2020).

Os resíduos do pescado, em especial, se caracterizam por não apresentar valor de mercado e o seu descarte acarretar danos ao meio ambiente quando feito de forma inadequada (REBOUÇAS *et al.*, 2012). Os principais produtos comercializados de Tilápias são os peixes inteiros congelados e os filés, estes últimos representam elevado valor agregado e maior interesse do consumidor (BOSCOLO; FEIDEN, 2007). No processo de filetagem, o rendimento é de apenas 35 a 40% do peso total do peixe (FITZSIMMONS *et al.*, 2011), gerando como consequência 60 a 70% de resíduos orgânicos (BOSCOLO; FEIDEN, 2007; VIDAL *et al.*, 2011).

A relação estimada entre cada resíduo e o peso total do peixe, segundo FAO (2020), mostra que cabeças representam 9 a 12 por cento do peso total do peixe, vísceras 12 a 18 por cento, pele 1 a 3 por cento, ossos 9 a 15 por cento e escamas cerca de 5 por cento. Os resíduos do pescado se mostram, por outro lado, como recursos versáteis, além da possibilidade de transformação e aproveitamento como alternativas agroindustriais (ŠLIŽYTE; RUSTAD; STORRØ, 2005).

1.4 Estruturas de alguns órgãos principais de peixes

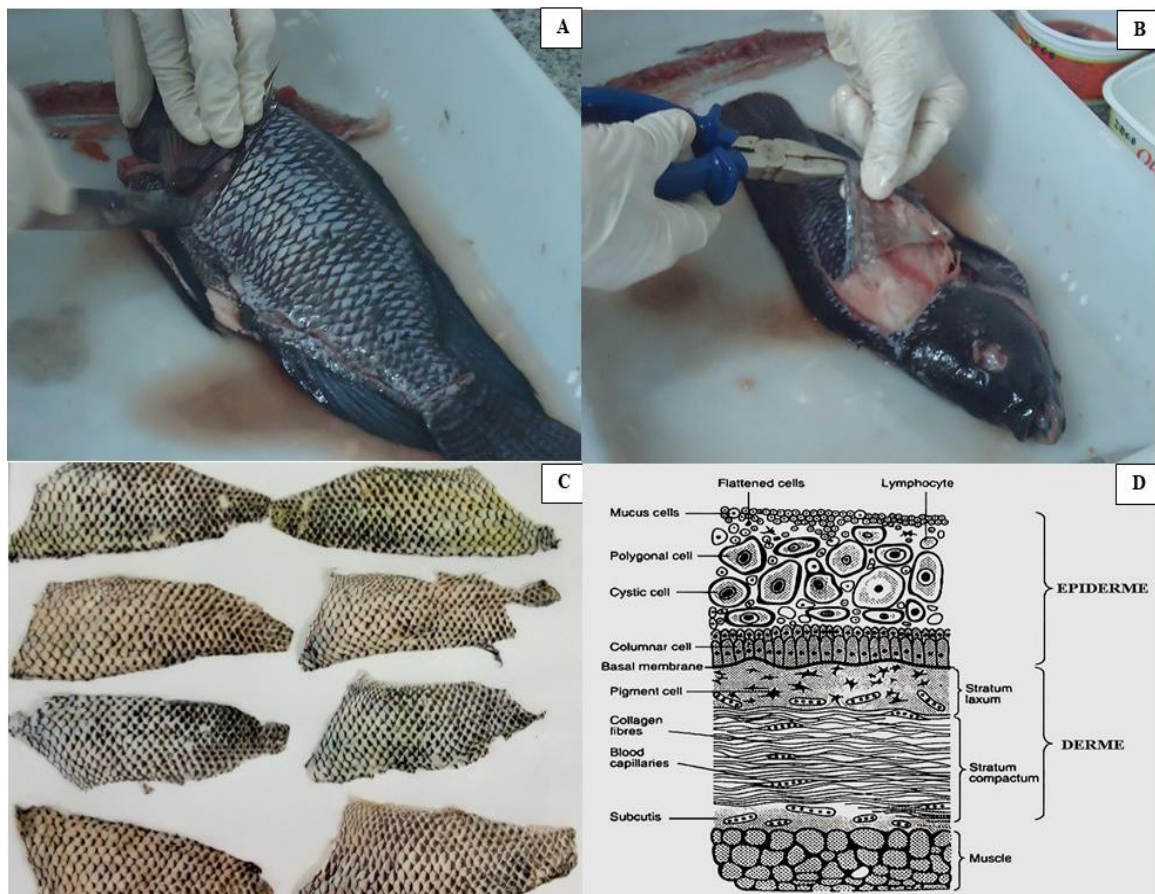
1.4.1 Pele

A pele de peixes difere da pele dos mamíferos por ser coberta por epiderme delgada, não apresentando glândulas sebáceas e, dependendo da espécie, podem possuir escamas (JUNQUEIRA *et al.*, 1983).

Os peixes são recobertos por pele e revestidos por uma secreção viscosa, o muco, produzido por um grande número de glândulas mucosas presentes na pele. O muco secretado permite a redução da resistência da água ao movimento de natação e atua na proteção impedindo a infestação por fungos e parasitas (BEMVENUTI; FISCHER, 2010).

A pele possui duas camadas: a epiderme de origem ectodérmica e a derme de origem mesodérmica, como é mostrado esquematicamente na Figura 1. Na derme se formam as escamas, e é onde se encontram as glândulas de veneno, mucosas, órgãos elétricos, órgãos bioluminescentes (fotóforos), órgãos sensoriais, os receptores de som e os pigmentos (BEMVENUTI; FISCHER, 2010).

Figura 1 – Morfologia e histologia da pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A - incisão lateral longitudinal de retirada da pele; **B** - remoção da pele sentido cabeça-cauda; **C** - pele desidratada; **D** - hierarquia morfológica da estrutura das camadas da pele.

Fonte: Autora (2019), (**A**, **B** e **C**); **D** - adaptado de <https://www.yourarticlelibrary.com/fish/anatomy>.

As principais funções fisiológicas da pele são excreção, proteção contra a invasão bacteriana e agentes exteriores e recepção de estímulos (SOUZA, 2004). É composta,

principalmente, por proteínas, lipídios, glicídios, sais minerais e água. A composição varia dependendo da espécie de peixe, sexo e idade (HOINACKI; MOREIRA; KIEFER, 1989). Em geral, as peles apresentam em sua composição em torno de 2% de lipídios e 1% de matéria mineral, sendo os principais elementos encontrados, o potássio, o magnésio e o fósforo. Estes minerais estão combinados na forma de cloretos, sulfatos e carbonato (HOINACKI; MOREIRA; KIEFER, 1989).

Histologicamente, a pele da Tilápia do Nilo é constituída por duas camadas teciduais, a epiderme e a derme (LAGLER *et al.*; 1977), sendo a primeira composta por células epiteliais pavimentosas, dispostas em camadas que contêm células produtoras de muco e de pigmentos e a segunda, formada por uma espessa camada de tecido conjuntivo. Desta forma, a pele de tilápia assemelha-se à de outros peixes teleósteos quanto à sua organização estrutural, por estar constituída de epiderme e derme (SOUZA *et al.*, 2021).

Devido às propriedades físico-mecânicas da pele de tilápia, por meio do curtimento, a indústria de beneficiamento do couro tem agregado valor a este subproduto, permitindo a manufatura do vestuário em geral, como jaquetas, coletes, cintos, pastas, bolsas, carteiras, souvenir e, principalmente, calçados (SOUZA, 2004).

A pele da Tilápia apresenta características microscópicas semelhantes à estrutura morfológica da pele humana (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017), mostrando-se como biomaterial com aplicabilidade clínica no tratamento de queimaduras. Este biomaterial tem sido utilizado como uma alternativa de curativo biológico para recobrimento de feridas na pele humana por queimadura devido à sua elevada compatibilidade.

A presença de GAGs na pele da Tilápia aponta como uma fonte promissora de suplemento antioxidante alternativo aos agentes sintéticos para criopreservação de sêmen de peixes (PEREIRA *et al.*, 2020 e 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2021) e anticoagulantes naturais comparando ao uso de heparina (RODRIGUES *et al.*, 2011b; SALLES *et al.*, 2017).

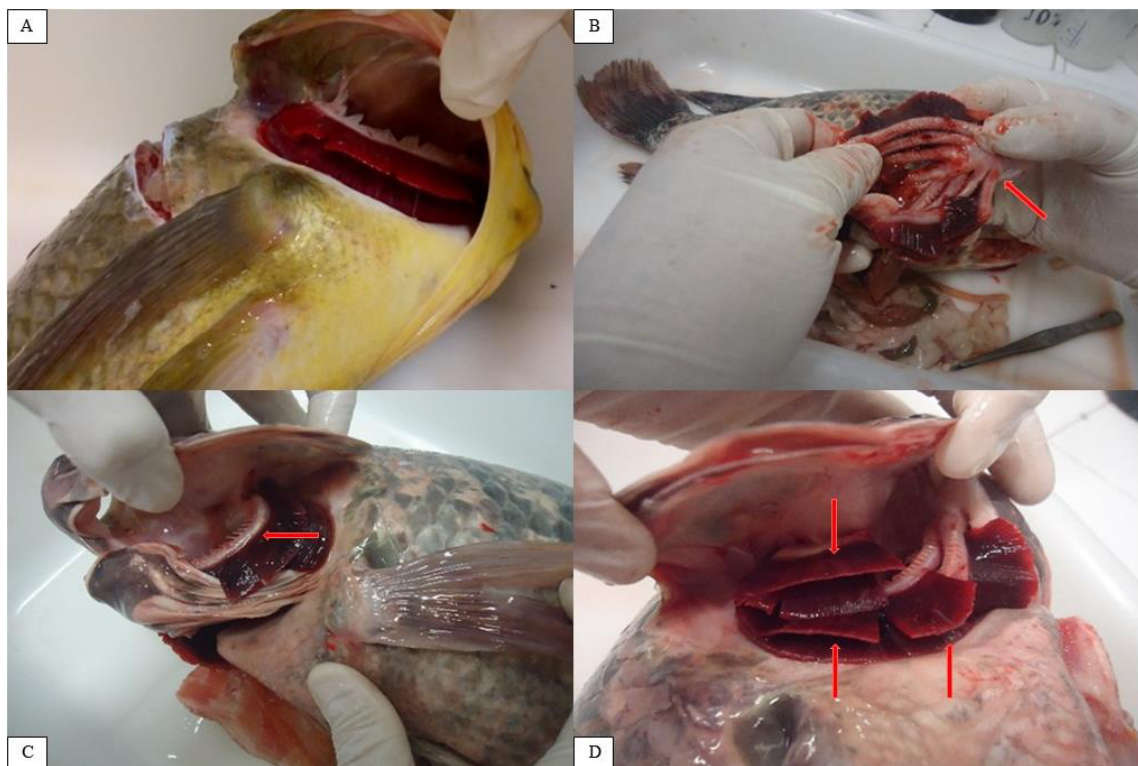
1.4.2 Brânquia

As brânquias, órgãos vitais para os peixes, são estruturas responsáveis pelas trocas gasosas, as quais estão envolvidas nos processos de osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de compostos nitrogenados (FONTAÍNHAS-FERNANDES *et al.*, 2008; TSENG; HWANG, 2008; TORRES *et al.*, 2010).

Histologicamente, o epitélio de revestimento branquial é representado por cinco principais tipos celulares: células pavimentosas, células mucosas, células de cloro, células não diferenciadas e células neuroepiteliais (LICHTENFELS, 1996). O epitélio branquial tem importante papel na manutenção osmótica e iônica dos peixes e as células que o constituem respondem direta ou indiretamente aos fatores ambientais e a alterações internas do organismo (LUPI *et al.*, 2007).

Responsáveis pelo processo respiratório dos peixes, as brânquias estão localizadas na cavidade opercular e são divididas em arcos de onde saem os filamentos branquiais com suas fileiras de lamelas secundárias (FERGUSSON, 1989), como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Morfologia da brânquia de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A - brânquia; **B** - base branquial; **C** - arco branquial e **D** - filamentos branquiais.

Fonte: Autora (2019).

Em tilápias, as brânquias estão localizadas simetricamente quanto à cavidade bucal e são constituídas por duas regiões bem definidas, os arcos branquiais e os filamentos branquiais (LEONARDO, *et al.*, 2001). Assim como a grande maioria dos teleósteos, as tilápias apresentam quatro arcos branquiais de cada lado da cabeça. Cada arco é composto por lamelas

primárias que se dividem em lamelas secundárias. São essas últimas as responsáveis pelas funções exercidas pelas brânquias, em especial pela troca gasosa (FÚRIA, 2005).

Quatro pares de arcos branquiais se estendem do piso até o teto da cavidade vestibular, estrutura constituída por tecido ósseo, coberto por uma membrana serosa, associado com músculos estriados abductor e adutor que facilitam o movimento das brânquias na respiração. Na membrana serosa passam os vasos sanguíneos que irrigam os filamentos e retornam o sangue nas trocas gasosas (TORRES; GONZÁLEZ; PEÑA, 2010). Cada arco branquial apresenta uma série de filamentos branquiais ou holobrânquias, cada um dos quais é constituído por duas metades, denominadas de hemibrânquias, formadas pelas lamelas branquiais, que proporcionam uma grande superfície que suporta as funções respiratória e excretora.

Os filamentos branquiais são especializações constituídas por um suporte cartilaginoso central hialino, arteríolas aferentes e eferentes e outros vasos anastomosados, compreendendo o seio venoso central (SANTOS *et al.*, 2007). Eles são cobertos com um epitélio plano simples e uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, contíguo com o revestimento de arcos branquiais e da mucosa oral da cavidade bucal. A evaginação do epitélio do filamento aumenta a área de superfície das brânquias e cada lamela é formada por um envelope de células apoiadas sobre uma membrana basal, suportadas por células pilares. Espaços entre células pilares, denominadas lacunas, conectam arteríolas aferentes e eferentes. A contratilidade de células pilares controlam o diâmetro lacunar regulando assim o fluxo de sangue (GENTEN; TERWINGHE; DANGUY, 2009; TORRES; GONZÁLEZ; PEÑA, 2010).

Nestas estruturas, GAGs com efeitos anticoagulantes foram encontrados na Carpa comum *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) como uma mistura de condroitim sulfato em vários níveis de sulfatação e de substâncias contendo glucosaminas pertencentes aos grupos sulfato de heparam ou heparina (WASSERMAN; BER; ALLALOUF, 1972).

1.4.3 Olho

Os peixes vivem em ambientes aquáticos onde a água absorve a luz de modo que, com o aumento da profundidade, a quantidade de luz disponível diminui rapidamente. As propriedades ópticas da água também fazem com que diferentes comprimentos de onda de luz sejam absorvidos em diferentes graus. A luz visível de comprimentos de onda longos (vermelho, laranja) é mais absorvida na água do que a luz de comprimentos de onda mais curtos

(verde, azul). A luz ultravioleta (comprimento de onda ainda menor do que a violeta) pode penetrar mais profundamente do que o espectro visual. Além dessas qualidades universais da água, diferentes corpos d'água podem absorver luz de diferentes comprimentos de onda devido à variação da presença de sal e/ou química na água (MARSHALL *et al.*; 2015).

Os olhos dos peixes não possuem pálpebras e glândulas lacrimais e estão localizados na lateral da cabeça com movimentos independentes, são semelhantes aos olhos dos vertebrados terrestres, mas, têm lentes mais esféricas do que estes (DOUGLAS; DJAMGOZ, 1990), na Figura 3 observa-se o olho da Tilápia do Nilo.

Figura 3 – Morfologia do olho de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A - olho de exemplar fresco; **B** - olho removido de exemplar abatido.

Fonte: Autora (2019).

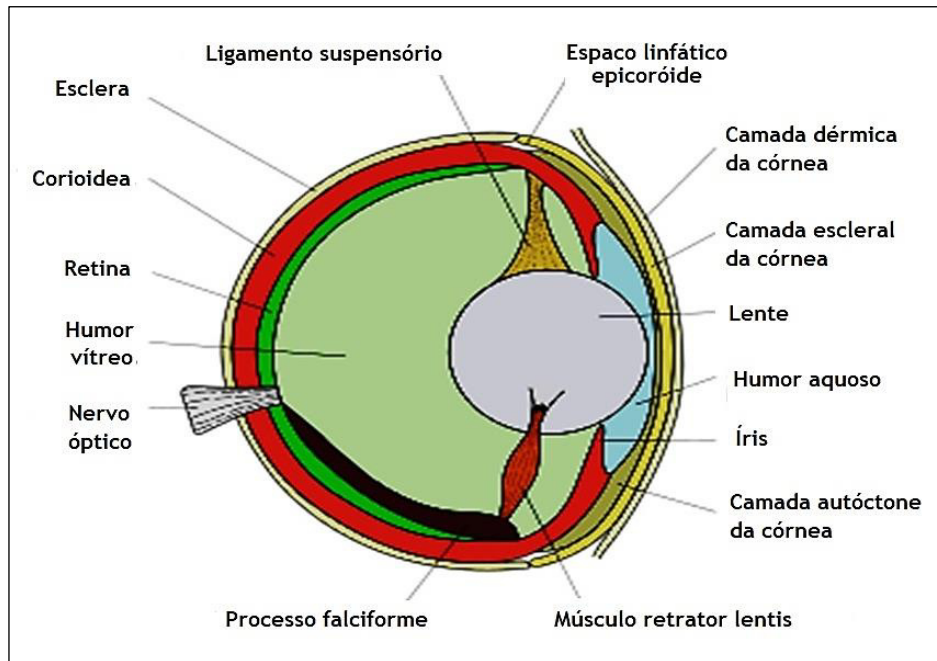
As retinas de peixes, geralmente, possuem células bastonetes e cones, para visão escotópica (em ambiente escuro) e fotópica (em ambiente iluminado), respectivamente, e a maioria das espécies tem visão em cores (DOUGLAS; DJAMGOZ, 1990).

Apesar de todos os peixes partilharem o mesmo desenho básico do olho, de acordo com a espécie, ocorrem diferenças porque aquilo que um animal vê, depende sobretudo do tipo de fotorreceptores (bastonetes e cones) presentes, das concentrações relativas e de como estão dispostos no plano retinal (FRITSCHES *et al.*, 2005), assim como da profundidade em que habitam.

A maior parte dos peixes é sensível à cor, contudo nem todos reconhecem a mesma faixa espectral e a visão noturna varia consideravelmente entre as espécies (FRITSCHES *et al.*, 2005). O olho dos peixes apresenta um cristalino esférico, denso e espesso e uma córnea quase

plana. O cristalino está fixo por um músculo refrator que pode movê-lo para perto da retina para fazer a acomodação (TURNER; SALLY, 2010), como é mostrado na Figura 4.

Figura 4 – Seção vertical diagramática através do olho de peixes.



Fonte: Visão em peixes https://pt.abcdef.wiki/wiki/Vision_in_fish.

A retina de peixes tem células em bastonete que fornecem alta sensibilidade visual em condições de pouca luz e células em cone que fornecem resolução temporal e espacial mais alta do que as células em bastonete são capazes. Elas permitem a possibilidade de visão de cores por meio da comparação da absorvância em diferentes tipos de cones (MARSHALL *et al.* 2015). A proporção de bastonetes para cones depende da ecologia das espécies de peixes, aqueles principalmente ativos durante o dia em águas claras terão mais cones do que aqueles que vivem em ambientes com pouca luz.

A visão colorida é útil em ambientes com uma faixa mais ampla de comprimentos de onda disponíveis, perto da superfície em águas claras, em vez de em águas profundas, onde persiste apenas uma estreita faixa de comprimentos de onda (MARSHALL *et al.* 2015). A distribuição dos fotorreceptores pela retina não é uniforme, podendo variar ao longo do tempo durante o desenvolvimento do indivíduo. Este é o caso quando a espécie normalmente se move entre diferentes ambientes durante seu ciclo de vida, por exemplo, de águas rasas a profundas ou de água doce ao oceano (DOUGLAS; DJAMGOZ, 1990).

1.4.4 Intestino

As características anatômicas do aparelho digestório dos peixes acham-se em estreita dependência com a natureza dos alimentos, as características do habitat, o estado nutricional e o estágio de desenvolvimento do indivíduo (SEIXAS FILHO *et al.*, 2000).

O intestino é um órgão geralmente tubular, por onde transita o alimento e no qual ocorre a digestão alcalina e a absorção dos nutrientes (FUGI; HAHN, 1991).

Este tubo se inicia na válvula pilórica e termina no reto, não sendo separado em delgado e grosso, como nos mamíferos. Possui glândulas digestivas e um suprimento abundante de vasos de sangue e de linfa, onde se completa a digestão iniciada no estômago (ROTTA, 2003).

No intestino é onde se completa a digestão da proteína iniciada no estômago e também ocorre a digestão final dos lipídeos e carboidratos, ocorre a maior parte da absorção dos nutrientes, íons e água oriundos da dieta, sendo os produtos da digestão mantidos em solução, o que facilita a absorção (COSTA *et al.*, 2015). Além da função de digestão e absorção, o intestino pode desempenhar outras funções, como auxiliar na osmorregulação ou na respiração (WILSON; CASTRO, 2010).

O comprimento do intestino varia conforme o hábito alimentar dos peixes e conforme as características do alimento ingerido. Apresenta-se curto nas espécies carnívoras e nas espécies onívoras, herbívoras, fitoplânctófagas e detritívoras que se alimentam de itens de difícil digestão e baixa digestibilidade, o intestino é mais longo comparado ao dos carnívoros (FRACALLOSSI; CYRINO, 2012).

Segundo critérios histofisiológicos, o intestino pode ser dividido em três segmentos: primeiro segmento ou proximal (60-75% do comprimento total), segundo segmento ou médio (20-25%) e terceiro segmento ou distal (5-15%) (MORRISON; MIYAKE; WRIGHT, 2001). O primeiro segmento do intestino encontra-se relacionado com a absorção de gorduras, o segundo segmento é responsável pela absorção de macromoléculas proteicas e o terceiro segmento encontra-se relacionado com a absorção de água e eletrólitos (STROBAND; VAN DER VEEN, 1981).

De modo geral, o trato digestório compreende o intestino anterior (esôfago e estômago), intestino médio (maior extensão) e intestino posterior (reto e ânus), esta distribuição é comum nos teleósteos à exceção dos peixes agástricos (COSTA *et al.*, 2015).

A Tilápia do Nilo é um peixe onívoro que se alimenta de itens de origem animal e vegetal - possui uma dieta mista e estruturas pouco especializadas. Frequentemente, consome

pequenos invertebrados, plantas e frutos (ROTTA, 2003). O trato gastrointestinal da Tilápia do Nilo, *O. niloticus*, segue um percurso complexo da passagem do alimento, que envolve múltiplas alças e espiras dispostas ao longo do intestino (SMITH *et al.*, 2000), a Figura 5 mostra o intestino de Tilápia do Nilo.

Figura 5 – Morfologia do intestino de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



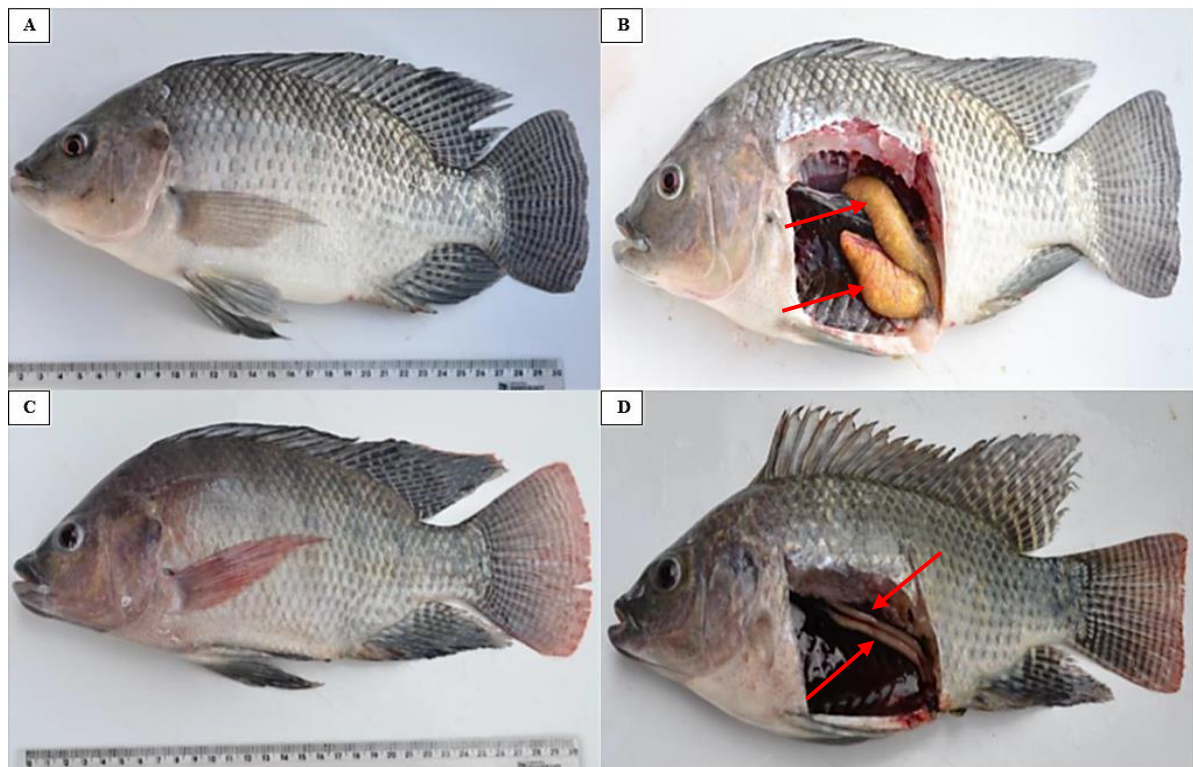
A - incisão lateral; **B** - intestino exposto em espiras; **C** - intestino estendido e **D** - intestino desdobrado.
Fonte: Autora (2019).

O trato gastrointestinal da Tilápia é bem alongado, devido, principalmente, ao intestino médio que ocupa grande área da cavidade peritoneal, constituindo principal local de digestão química e absorção dos nutrientes (WILSON; CASTRO, 2010).

1.4.5 Gônada

A Tilápia apresenta dimorfismo sexual observável, estando amplamente, descrito na literatura. O macho expressa coloração mais rosada em suas nadadeiras, enquanto a fêmea exibe colorações esbranquiçadas, como é visto na Figura 6 (A e C). Os indivíduos em idade reprodutiva podem ser distinguidos, externamente, pelo desenvolvimento das gônadas que permitem a visualização da diferenciação entre os sexos (BABIKER; IBRAHIM, 1979). Por meio da observação das papilas genitais, com os animais em posição ventral, verifica-se nos machos dois orifícios, o ânus e o canal urinário e o canal seminal que se fundem em um único orifício, nas fêmeas não ocorre essa junção e podendo-se observar três poros, o ânus, a abertura do oviduto e o orifício urinário (TURRA *et al.*, 2010). Os ovários e testículos são órgãos pares, alongados, fusiformes e globosos, estão localizados na porção dorsal da cavidade celomática, um de cada lado da vesícula gasosa e dorsalmente ao tubo digestivo, cada uma das gônadas prolonga-se no sentido craniocaudal (RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005). A Figura 6 (B e D) mostra as gônadas de indivíduos adultos.

Figura 6 – Morfologia das gônadas de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A - fêmea adulta; B - ovários; C - macho adulto e D – testículos.

Fonte: Dantas - IFRN (2018).

As fêmeas possuem um par de ovários, localizados ventralmente à bexiga natatória e longitudinalmente ao corpo, são estruturas, geralmente, alongadas dispostas na porção dorsal da cavidade abdominal. O tamanho e o peso estão relacionados à idade e ao estado de maturidade que o peixe se encontra (SANTOS, 1991).

Histologicamente, os ovários são revestidos pela túnica albugínea constituídos de tecido conjuntivo, fibras musculares lisas e vasos sanguíneos que emite septos para o interior do órgão formando lamelas ovulíferas que delimitam a cavidade ovariana central e onde se encontram ovogônias e ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (RODRIGUES; QUEROL; BRACCINI, 2005).

Apresentam um grande volume, exibem coloração alaranjada e intensa irrigação por vasos sanguíneos. A coloração alaranjada resulta dos pigmentos e lipídios presentes em sua composição de nutrientes. Os óvulos podem ser visualizados a olho nu por seu grande tamanho em consequência do acúmulo de vitelo que serve de nutrição para o desenvolvimento embrionário (SANTOS, 1991).

Os machos possuem um par de testículos, os quais são longitudinais, compactos e tubulares, estão dispostos, em relação à forma e à região, na porção dorsal da cavidade abdominal da mesma forma que os ovários (SILVA *et al*, 2015). São estruturas localizadas na cavidade celomática, podendo estar parcialmente, fundidos entre si, apresentando tamanho similar entre o direito e o esquerdo (LE GAC; LOIR, 1999).

Os testículos apresentam menor volume, coloração esbranquiçada e vasta irrigação por vasos sanguíneos (CARVALHO; FORESTI, 1996). Os espermatozoides são estruturas microscópicas, não sendo possível sua visualização a olho nu.

Na estruturação histológica dos testículos verifica-se, que este órgão é formado por uma túnica albugínea, a qual emite septos para o interior do órgão delimitando os compartimentos tubular e intersticial, que tem as funções espermatogênica e androgênica (PALLER; GUERREIRO, 2001; NAGAHAMA; DEVLIN, 2002). No compartimento intersticial ou intertubular estão situados vasos sanguíneos, fibras nervosas, células e fibras do tecido conjuntivo (RUSSEL; ETTLIN; SHINNA HIKIM, 1990; LACERDA, 2006).

1.5 Glicosaminoglicanos: aspectos químicos e propriedade antioxidante

Os GAGs, antes denominados mucopolissacarídeos, são carboidratos poliméricos, na maioria sulfatados, compostos por unidades de dissacarídeos repetitivas. São heteropolissacarídeos lineares que interagem com muitas proteínas celulares.

Eles contêm aminoaçúcares, como glucosamina e galactosamina e açúcares ácidos, como ácido glucurônico e ácido idurônico (BADRI *et al.*, 2018). A presença de grupamentos sulfato e carboxilas dos ácidos urônicos conferem-lhes elevada carga aniônica.

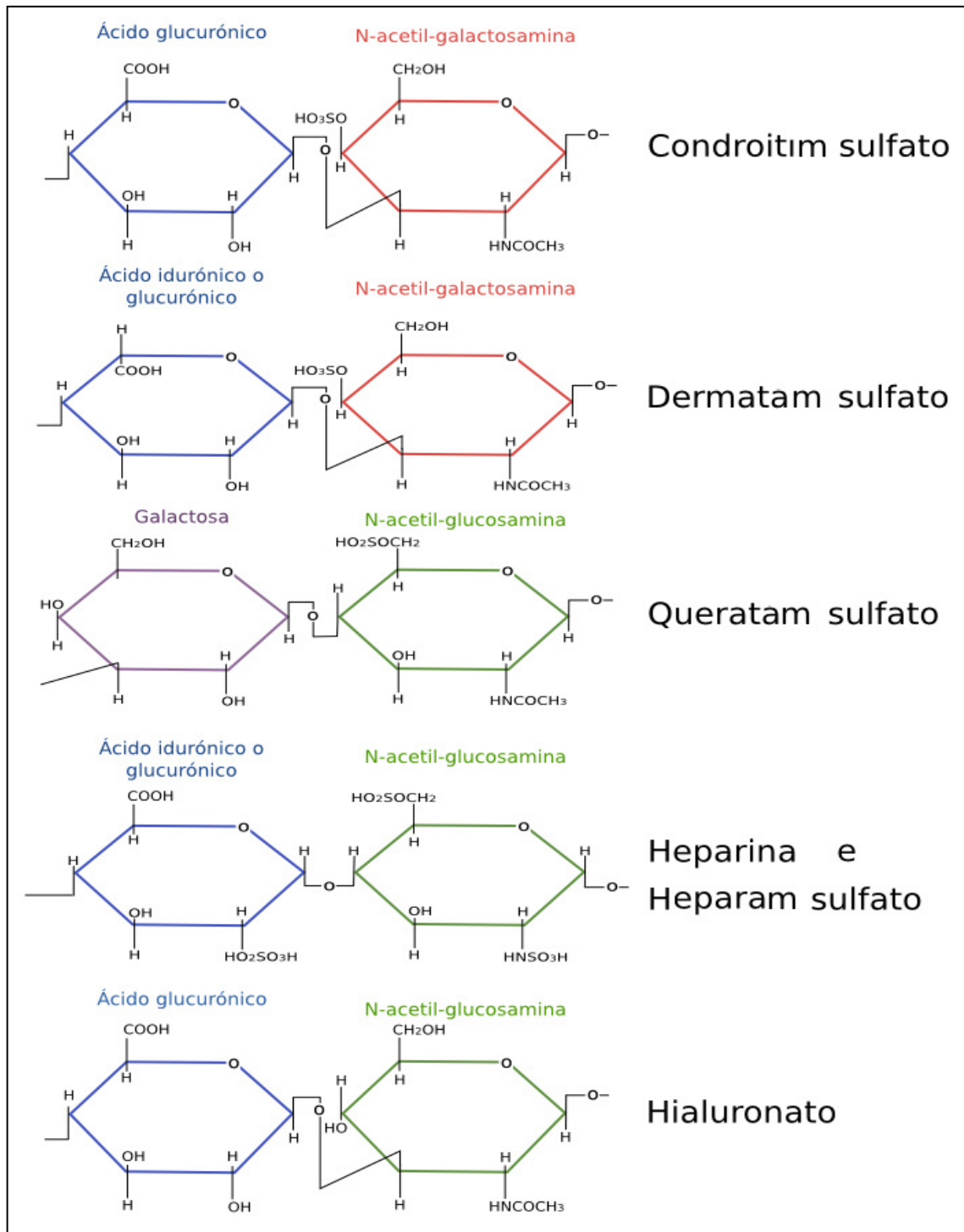
Os GAGs correspondem a uma família de polissacarídeos lineares sulfatados altamente complexos produzidos em vertebrados e invertebrados (VOLPI; MACCARI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2015), ocorrendo em todos os filos animais que apresentam organização tissular, desde os poríferos até os cordados (MEDEIROS *et al.*, 2000).

Estão presentes nos animais variando quanto à quantidade, tipo de ligação glicosídica e ao grau e posição de sulfatação, sendo formados por unidades alternantes de N-acetil-galactosamina ou glicosamina ligada a um açúcar não aminado, como grupos carboxilados de ácido urônico (ácido D-glicurônico ou ácido L-idurônico) ou uma galactose (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A variabilidade dos diferentes GAGs deve-se às suas diferenças químicas, como o peso molecular, unidades monossacarídicas, posição do grupamento sulfato e tipo de ligação glicosídica (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Nos vertebrados, em especial, tais polímeros são encontrados em quatro tipos essenciais de tecido: epitelial, nervoso, muscular e conjuntivo. Nos tecidos conjuntivos, que incluem cartilagens, ossos e sangue, as células se encontram bastante espaçadas entre si, estando este espaço preenchido por substâncias secretadas por estas células, determinando a matriz extracelular. Essa estrutura é caracterizada por uma rede complexa composta por quatro classes principais de macromoléculas, a saber: colágenos, proteoglicanos, glicoproteínas adesivas e GAGs (SOUZA; PINHAL, 2011).

Os GAGs participam em numerosas funções celulares e exibem princípios ativos importantes para a elaboração de medicamentos. Os GAGs mais comuns são condroitim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), queratam sulfato (QS), heparina (HEP), heparam sulfato (HS) e ácido hialurônico (AH). Com exceção ao AH que não possui sulfatação e pode ser encontrado de forma livre, todos os GAGs ocorrem nos tecidos como proteoglicanos (LI; VLODAVSKY, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2006). A Figura 7 mostra a estrutura química dos principais GAGs.

Figura 7 – Estruturas químicas dos principais GAGs.



Fonte: que son los proteoglicanos - shophu.bsdyugstore.ru

1.6. Prospecção de GAGs antioxidantes em resíduos de pescado

Sabe-se que substâncias oxidantes podem ser formadas no citoplasma, na membrana celular e na mitocôndria e o seu alvo no organismo pode ser o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, sendo este alvo relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997). Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (AMES; SHIGENAGA; HAGEN, 1993; WITZUM, 1994; ROY; KULKARNI, 1996; STAHL; SIES, 1997).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir as taxas de oxidação. Assim, antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995).

Estudos diversos têm sugerido que alguns GAGs possuem propriedade antioxidante, como AH e CS, que inibem a peroxidação lipídica por quelarem metais de transição como o Cu^{2+} e o Fe^{2+} (ALBERTINI *et al.*, 2000). O aumento dos níveis de GAGs no plasma pode representar uma resposta biológica à produção de radicais livres. O uso desses componentes como agentes terapêuticos mostra resultados positivos em modelos animais experimentais (FRASER *et al.*, 1997).

A literatura é ainda escassa sobre GAGs antioxidantes de animais aquáticos. Por exemplo, Bai *et al.* (2018) relataram que os GAGs extraídos da serpente marinha *Lapemis curtus* (Shaw, 1802) exibiram propriedades antioxidantes. Na pele e músculo da lula *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758) Jridi *et al.* (2019) encontraram GAGs como fontes promissoras de antioxidantes e antibacterianos. A busca por novos compostos antioxidantes derivados de diferentes fontes naturais é justificada pelos riscos associados ao emprego dos antioxidantes sintéticos, tais como BHA (butilhidroxianisol) e BHT (butilhidroxitolueno) (RAMALHO; JORGE, 2006), na indústria do pescado e de alimentos, os quais podem provocar danos e mutações no DNA levando a neoplasias (câncer) e toxicidade por causarem efeitos indesejáveis em enzimas de vários órgãos humanos (TIVERON, 2010).

GAGs despertam interesses crescentes por apresentarem, por exemplo, elevada biocompatibilidade, propriedades bioativas e antimicrobiana, como GAG HEP, um dos fármacos naturais mais utilizados no mundo e empregado como anticoagulante em distúrbios do sistema circulatório na clínica médica (CAHÚ; BEZERRA, 2021).

Estudos anteriores demonstraram que resíduos sólidos descartados da filetagem de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) revelaram GAGs com importância biotecnológica (RODRIGUES *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2017). Por exemplo, DS da pele foi capaz de modificar *in vitro* a formação de coágulo sanguíneo, entretanto, com menos eficácia do que HEP e DS de mamífero (RODRIGUES *et al.*, 2011b; SALLES *et al.*, 2017). Nogueira *et al.* (2019) identificaram, por eletroforese e análises estruturais, CS/DS/HS em vísceras de Tilápia apresentando efeito anticoagulante.

Mais recentemente, Pereira *et al.* (2020 e 2021) demonstraram GAGs isolados da pele de *O. niloticus*, quando *in vitro*, possuindo efeitos antioxidantes e como suplementos seguros no meio criodiluidor do sêmen de Tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). De papel semelhante, Nascimento *et al.* (2021) comprovaram ação antioxidante *in vitro* de GAGs extraídos da pele de Tilápia como coadjuvante na criopreservação de sêmen de Curimatã, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875).

Diante, ainda, da dificuldade na obtenção de polissacarídeos seguros de fontes terrestres (intestino e pulmão bovino e suíno), que necessitam de um rigoroso controle de qualidade devidos aos riscos de contaminação biológica, química e viral (MELO *et al.*, 2008), o aproveitamento de resíduos gerados da filetagem de peixes surge como plataformas inovadoras, procedentes das etapas da cadeia produtiva do pescado, para exploração de macromoléculas bioativas (JRIDI *et al.*, 2019; BAI *et al.*, 2018; POMIN, 2015; VALCARCEL *et al.*, 2017).

Considerando o exposto, este trabalho propôs avaliar a distribuição, as características moleculares do perfil de GAGs presentes em diferentes resíduos de *O. niloticus* e a capacidade antioxidante *in vitro* de base branquial.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção, tratamento e determinação da massa desidratada da matéria-prima

Exemplares adultos masculinizados de Tilápia do Nilo foram adquiridos do plantel mantido pela Estação de Aquicultura Prof^o. Dr. Raimundo Saraiva da Costa do Centro de Ciências Agrárias, UFC. Estes foram cultivados em uma estrutura composta por um sistema de recirculação de água que envolveu três tanques retangulares de alvenaria, de dimensões 3,00 × 0,80 × 0,85 m, com volume útil de aproximadamente 2 m³, acoplados a decantador e reator biológico ambos de 500 L e um filtro mecânico pressurizado.

O cultivo dos peixes foi realizado no período de 01 de maio de 2019 a 27 de junho de 2019. Dos 282 peixes machos cultivados, foram cedidos 50 exemplares com idades entre 4 a 5 meses para a execução do presente trabalho.

A espécie foi catalogada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o cadastro AA4816B e a proposta aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará sob o CEUA nº 6974061020 (ID 001773), sob a responsabilidade do Prof^o. Dr. Oscar Pacheco Passos Neto e como membro de equipe Daniele Ferreira Marques.

Dos peixes cultivados, cinquenta indivíduos foram despescados e submetidos a choque térmico por 1 hora, na proporção 1:1,1 (kg biomassa: kg gelo) em caixas isotérmicas e transportados, imediatamente, do abate até o Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura - CEBIAQUA/UFC, do Departamento de Engenharia de Pesca (UFC).

Após o abate, os animais (Figura 8) seguiram para biometria determinando-se o comprimento total (cm) com régua e o peso (g) usando-se uma balança de precisão 1 g, cujos valores médios finais foram de $28,46 \pm 2,51$ cm e $409,14 \pm 95,66$ g, respectivamente.

A biomassa final dos exemplares de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) utilizada nesta pesquisa totalizou 52,93 kg.

Figura 8 – Exemplar de Tilápia do Nilo despescado e abatido procedente da Estação de Aquicultura do DEP/CCA/UFC.



Fonte: Autora (2019).

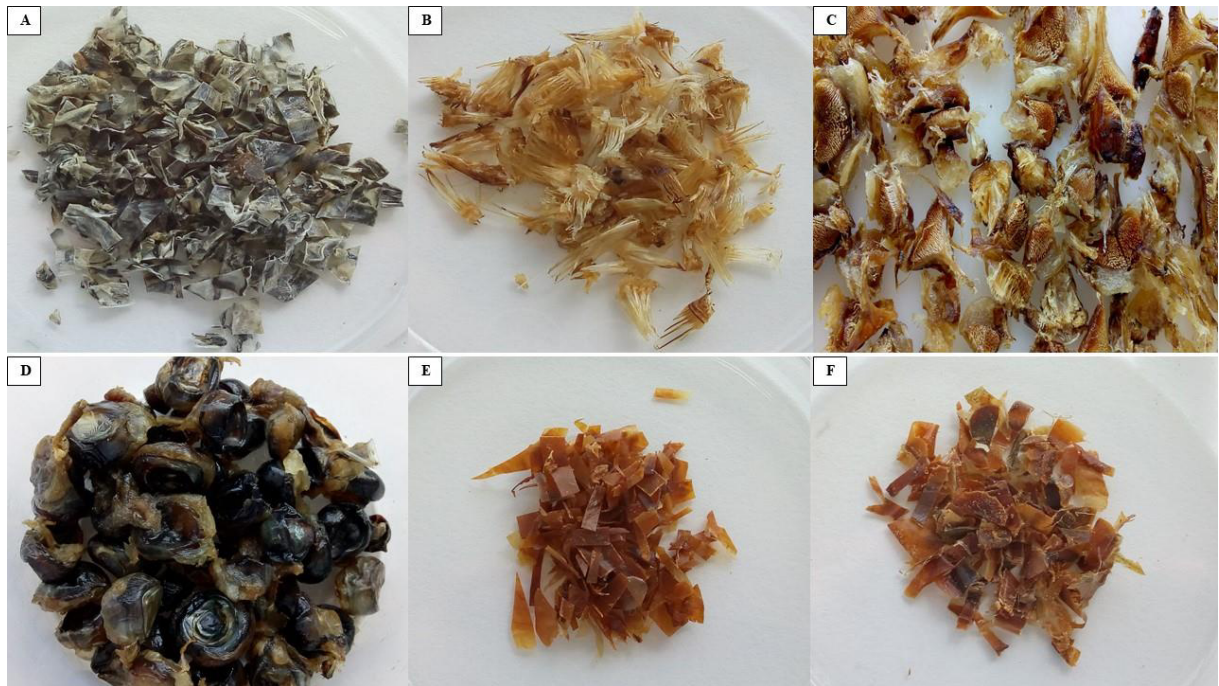
Após a biometria os animais foram submetidos aos procedimentos de escamação, evisceração e remoção de cinco diferentes resíduos (pele, brânquia, olho, intestino e gônada) com o auxílio de faca, alicate e tesouras trinchante e cirúrgica.

Posteriormente, fez-se a separação dos resíduos, seguida de lavagem com água destilada e desidratação em estufa sob circulação de ar (45°C; 24 h). Desidratados, os resíduos foram acondicionados, separadamente, em recipientes de polietileno fechados e devidamente identificados.

Por fim, os resíduos foram triturados, pesados (g) e armazenados em local fresco, seco e ao abrigo da luz até a realização das análises experimentais.

Os materiais desidratados obtidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) são mostrados na Figura 9.

Figura 9 – Resíduos desidratados de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A - pele; B - arco branquial; C - base branquial; D - olho; E - intestino e F - gônada.

Fonte: Autora (2020).

De cada resíduo a porcentagem (%) de massa desidratada foi calculada a partir da biomassa total de peixes, utilizando-se para isto a fórmula:

$$M(\%) = \frac{m_D}{M_T} \times 100$$

Em que,

M (%) = porcentagem de massa desidratada de resíduo ou rendimento relativo de massa;

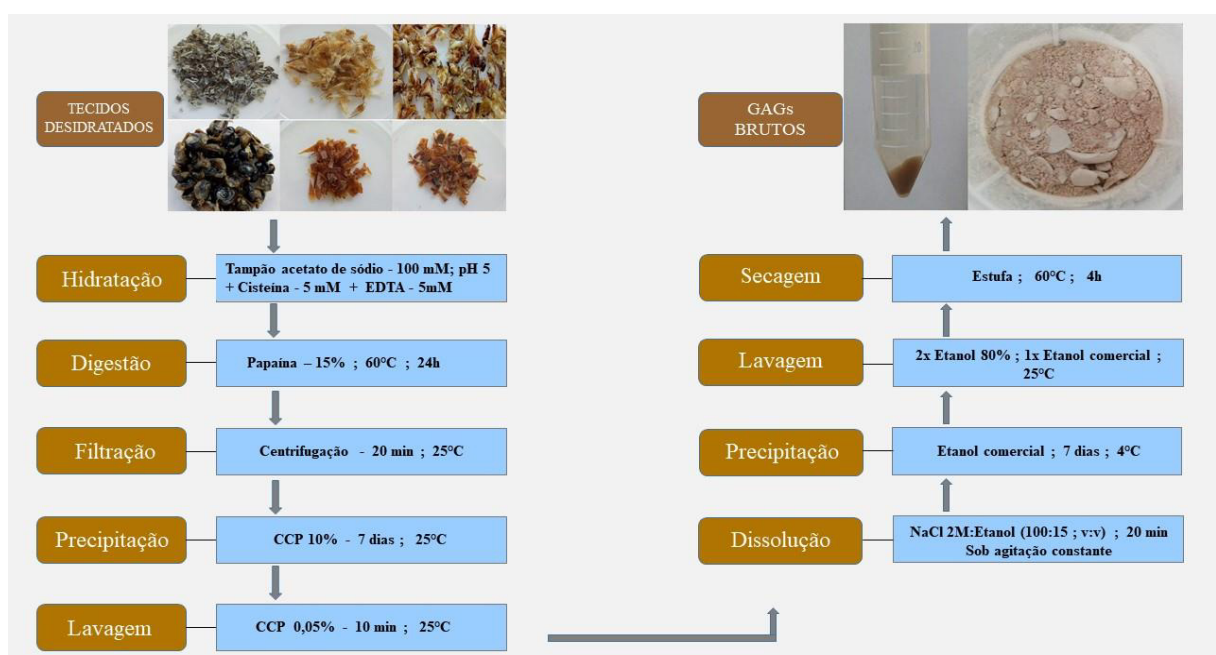
m_D (g) = massa desidratada de resíduo;

M_T (g) = biomassa total.

2.2 Extração dos GAGs

Os GAGs foram extraídos de massas desidratadas de cinco diferentes resíduos (brânquia – arco e base, pele, olho, intestino e gônada) com modificações de Rodrigues *et al.* (2011a) e Salles *et al.* (2017), baseado em Farias *et al.* (2000). Para isso, 10g de massa desidratada de cada resíduo foram incubadas por 24 h com papaína a 15%, em banho-maria a 60°C, usando-se 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5, contendo cisteína e EDTA, ambos a 5 mM. Após a incubação, fez-se filtração em tela de náilon 60 µm, centrifugou-se (20 minutos; 7.280 × g) e, ao sobrenadante, adicionados 5 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10% para precipitação, em temperatura ambiente, por 7 dias. Depois de precipitados, os GAGs foram lavados com 100 mL de CCP 0,05%, centrifugados (20 minutos; 7.280 × g) e, em seguida, dissolvidos em 50 mL de solução de NaCl 2M: etanol comercial (100:15; v:v) durante 20 minutos sob agitação mecânica constante. Após dissolução, foram adicionados 100 mL de etanol comercial para precipitação dos GAGs a 4°C por 7 dias. Depois da precipitação alcoólica, GAGs foram centrifugados (20 minutos; 7.280 × g) seguido de duas lavagens com 100 mL de etanol a 80% e outra com mesmo volume de etanol comercial. Os GAGs após centrifugados (20 minutos; 7.280 × g) foram, finalmente, levados à estufa para secagem sob circulação de ar (60°C; 4 h) e determinação do rendimento bruto (Figura 10), com base em cada matéria-prima desidratada (n = 3).

Figura 10 – Fluxograma de extração de GAGs dos resíduos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Autora (2020).

2.3 Ensaio de metacromasia

A detecção de GAGs sulfatados extraídos dos diferentes resíduos removidos de *O. niloticus* (brânquia – arco e base, pele, olho, intestino e gônadas) foi avaliada, a partir de concentrações crescentes das amostras preparadas (9µg, 18µg e 27 µg) de cada material obtido, por método colorimétrico (TAYLOR; JEIFREE, 1969) usando 1,0 mL do corante catiônico azul 1,9-dimetilmetileno como indicador de reação, cuja presença de sulfatação é caracterizada pelo complexo formado na cor violeta (FARNDALÉ; SAYERS; BARRETT, 1982; FARNDALÉ; BUTTLE; BARRETT, 1986).

2.4 Caracterização físico-química de GAGs por eletroforeses em gel de agarose e em gel de poliacrilamida

A caracterização físico-química dos GAGs extraídos de cada resíduo foi realizada por eletroforeses em gel de agarose, quanto ao padrão e densidade de carga e, em gel de poliacrilamida, quanto à distribuição de massa molecular.

Os padrões condroitim-6-sulfato (~ 60 kDa), condroitim-4-sulfato (~ 40 kDa), dextrana sulfatada (~ 8 kDa), dermatam sulfato (~ 40 kDa) e heparina (~14 kDa) (VOLPI; MACCARI, 2002; SALLES *et al.*, 2017) foram usados para identificação dos GAGs extraídos de cada resíduo.

A avaliação do padrão e densidade de carga, primeira técnica, realizou-se com a amostra de GAGs (~ 12 µg) e os padrões aplicados no gel de agarose 0,5% preparado com o tampão 1,3-acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0) e a corrida realizada em voltagem constante (120 V; 1h). Após a corrida, os GAGs presentes no gel foram fixados com solução de N-cetil-N,N,N-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 horas e, em seguida, desidratado (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

A verificação da distribuição de peso molecular, segunda técnica, dos GAGs e padrões aplicados no gel de poliacrilamida 6% foi executada em sistema tampão Tris/HCl 0,02 M (pH 8,6) e a corrida realizada em 500 mA por 1 hora (SALLES *et al.*, 2017).

Os GAGs presentes em ambos os géis desidratados ou não em estufa sob circulação de ar (60°C; 6 h), obtidos pelas referidas técnicas, foram revelados com azul de toluidina 0,1% e "stains-all" e, posteriormente, os géis foram descorados com solução contendo etanol

absoluto, água destilada e ácido acético ou com uso de água destilada (DIETRICH; DIETRICH, 1976; ANDRADE *et al.*, 2017).

2.5 Análise estrutural dos GAGs por espectroscopia de infravermelho

A natureza molecular dos GAGs (~10 mg) obtidos de diferentes resíduos de *O. niloticus* foi avaliada por espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier, comumente utilizada na caracterização estrutural de carboidratos. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro PERKIN ELMER SPECTRUM 100, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), na região de 4000 a 500 cm^{-1} .

2.6 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*

Para análise do potencial antioxidante, os GAGs de base branquial foram utilizados por se apresentarem em maior quantidade que nos demais resíduos de Tilápia do Nilo avaliados.

2.6.1 Capacidade de sequestrar o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

A capacidade de sequestro *in vitro* dos GAGs foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Ye *et al.* (2011), por meio da reação de 0,5 mL das amostras, 3 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,5 mM em etanol. A leitura da absorbância aferiu-se em espectrofotômetro a 517 nm decorridos 45 minutos de reação (fase estável) no escuro. As amostras passaram por avaliação em diferentes concentrações (0,125 a 4 mg/mL) e a substância padrão, butilhidroxitolueno, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antioxidante foi calculada a partir da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH presente nas amostras e no padrão em relação à solução referência (DPPH em etanol), pela fórmula:

$$\text{Capacidade de sequestro do radical DPPH (\%)} = 1 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) \times 100] / A_{\text{controle}}$$

Em que,

A_{amostra} = absorvância em 517 nm da solução de DPPH com amostra;

A_{branco} = absorvância em 517 nm da amostra em álcool etílico;

A_{controle} = absorvância em 517 nm da solução de DPPH.

2.6.2 Habilidade de quelação do íon ferroso (FIC)

O ensaio de quelação do íon ferroso seguiu o método descrito por Chew *et al.* (2008) com modificações. Em tubos, fez-se a reação de 1,0 mL de sulfato ferroso (FeSO_4) 0,1 mM, 1,0 mL de amostra de GAGs em diferentes concentrações (0,125 a 4 mg/mL) e 1,0 mL de ferrozina 0,25 mM sendo agitados por 1,0 min. Transcorridos 10 min, mediu-se a absorvância em espectrofotômetro a 562 nm. Todas as reações foram realizadas em triplicata, utilizando-se EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) como controle positivo. Os resultados expressos como capacidade quelante do íon ferroso (%) e calculados pela fórmula:

$$\text{Habilidade de quelação do íon ferroso (\%)} = [A_0 - (A - A_b) / A_0] \times 100$$

Em que,

A_0 = absorvância em 562 nm dos reagentes sem amostra;

A = absorvância em 562 nm da mistura reacional;

A_b = absorvância em 562 nm da amostra sem reagentes.

2.6.3 Capacidade antioxidante total

O ensaio da capacidade antioxidante total foi realizado pela metodologia apresentada por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), na qual amostras de 0,3 mL de GAGs a concentrações variando de 0,125 a 4 mg/mL foram adicionadas a uma solução de 3 mL contendo molibdato de amônio 4 mM, ácido sulfúrico 0,6 M e fosfato de sódio 28 mM. A mistura reacional foi incubada a 95° C durante 90 min. As amostras foram resfriadas a 25° C e a absorvância medida a 695 nm. O branco foi obtido substituindo-se a amostra por água destilada. O ácido ascórbico (400 µg/mL) foi utilizado como controle positivo e considerando-se como 100% de efeito antioxidante no ensaio.

Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em termos de capacidade antioxidante total (%) e calculados pela fórmula:

$$\text{Capacidade antioxidante total (\%)} = [(A - A_0) / (A_b - A_0)] \times 100$$

Em que,

A = absorbância em 695 nm de reagentes com amostra;

A₀ = absorbância em 695 de reagentes com água;

A_b = absorbância em 695 de ácido ascórbico (controle).

2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos como média e desvio-padrão (n = 3). Os valores de rendimento de GAGs, de cada resíduo, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, em caso de diferença estatística, foi aplicado o teste de Tukey, considerando-se $p < 0,05$.

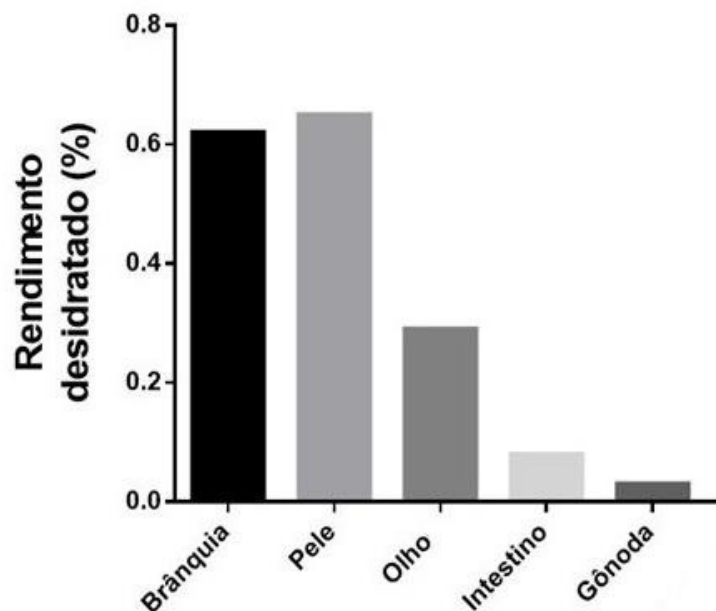
Quanto à resposta do potencial antioxidante *in vitro*, os valores obtidos foram analisados pelo teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, utilizando-se $p < 0,05$ como significativo. Todas as análises dos dados e as representações gráficas foram executadas pelo programa *Graphpad*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento de resíduos obtidos de Tilápia

As massas desidratadas, dos diferentes resíduos provenientes de 50 exemplares de Tilápia, cedidos pela Estação de Aquicultura/UFC, apresentaram percentagens maiores para resíduos removidos das partes da anatomia externa deste peixe que as quantidades obtidas da sua cavidade abdominal, a partir da biomassa total de peixe avaliada. Segundo o Gráfico 1, pele (0,65%), brânquia (0,62%) e olho (0,29%) detiveram maiores rendimentos em massa desidratada que intestino e gônada (0,08 e 0,03%, respectivamente), perfazendo-se os dois primeiros, comparativamente, o dobro da quantidade que de olho e, oito e vinte e uma vezes maiores considerando-se intestino e gônada, respectivamente. Em geral, pele representou rendimento majoritário dos resíduos totais obtidos dos indivíduos de Tilápia cultivados.

Gráfico 1 – Rendimentos (%) de massa desidratada, por resíduo, de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Fonte: Autora (2021).

Segundo a FAO (2020), a porcentagem relativa em massa é estimada entre cada resíduo e peso do peixe. A filetagem de peixes, por consequência, ocasiona uma quantidade substancial de resíduos orgânicos gerados pela indústria aquícola, tradicionalmente descartados

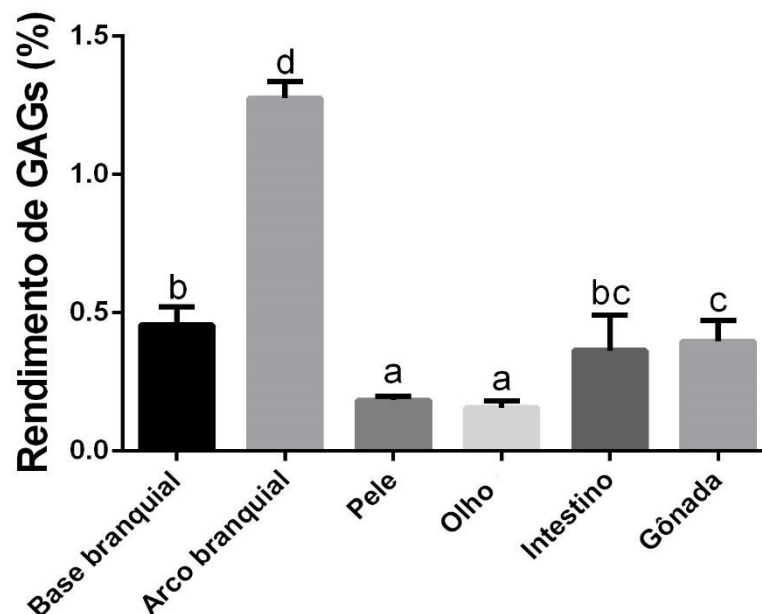
pela falta de um uso adequado, cujos volumes variam entre espécie e tamanho e que representam mais da metade do peso do peixe. Quando desidratados, obviamente, a maior perda do peso é de água de constituição, esta também variando entre as espécies e partes de pescado (OGAWA; MAIA, 1999; MOREIRA *et al.*, 2001).

3.2 Rendimento de GAGs brutos nos diferentes resíduos de Tilápia

Neste trabalho, Tilápia cultivada em sistema de recirculação de água usando tanques de alvenaria apresentou resíduos ricos em GAGs, cuja quantidade variou com a matéria-prima utilizada (Gráfico 2).

O emprego do método enzimático com papaína, seguido de precipitações com CCP e álcool, mostrou-se eficaz na obtenção de GAGs brutos presentes nos diferentes resíduos desidratados removidos de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*), cujo protocolo já vem sendo utilizado na recuperação de GAGs de pele desse Ciclídeo para diferentes usos (RODRIGUES *et al.*, 2011; SALLES *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020 e 2021; NASCIMENTO *et al.*, 2021).

Gráfico 2 – Rendimentos (%) dos GAGs brutos extraídos dos diferentes resíduos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Letras diferentes indicam diferença estatística entre colunas (ANOVA, Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 3$).

Fonte: Autora (2021).

Dentre os cinco resíduos avaliados de Tilápia, brânquia – arco e base ($1,28 \pm 0,06\%$ e $0,46 \pm 0,07\%$, respectivamente, totalizando $1,74 \pm 0,05\%$ - Tabela 1) mostrou-se a fonte majoritária em GAGs, cuja disponibilidade na região do arco branquial foi 2,78 vezes maior ($p < 0,05$) que em base branquial, desses compostos após secos em estufa, baseado nos estudos de Wasserman, Ber e Allalouf (1972) e Regnault e Durand (1998), estes autores encontraram também, respectivamente, GAGs em brânquias do peixe Carpa comum (*Cyprinus carpio*) e do caranguejo *Carcinus maenas*, no uso da extração com papaína.

Tabela 1 – Comparação de rendimento (%) de GAGs, por resíduo, de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com outras fontes animais.

Espécie	Resíduo	Protocolo	Rendimento*	Referência
Tilápia do Nilo	Brânquia	Papaína, pH 5,0	$1,74 \pm 0,05$	Esta pesquisa
		24h, 60°C		
Atum do Pacífico		N-Amano, pH 7,0	$0,20 \pm 0,00$	Arima <i>et al.</i> (2013)
		7d, 55°C		
Tilápia do Nilo	Pele	Papaína, pH 5,0	$0,18 \pm 0,02$	Esta pesquisa
		24h, 60°C		
Pele suína		Papaína, pH 6,5	$0,01 \pm 0,00$	Silva (2018)
		18h, 60°C		
Tilápia do Nilo	Olho	Papaína, pH 5,0	$0,16 \pm 0,03$	Esta pesquisa
		24h, 60°C		
Córnea bovina		Papaína, pH 6,5	$0,17 \pm 0,00$	Silva (2018)
		18h, 60°C		
Tilápia do Nilo	Intestino	Papaína, pH 5,0	$0,36 \pm 0,10$	Esta pesquisa
		24h, 60°C		
Atum do Pacífico		N-Amano, pH 7,0	$0,28 \pm 0,00$	Arima <i>et al.</i> (2013)
		7d, 55°C		
Tilápia do Nilo	Gônada	Papaína, pH 5,0	$0,40 \pm 0,08$	Esta pesquisa
		24h, 60°C		

*Porcentagem de GAGs baseada na matéria-prima inicial.

Fonte: Autora (2021).

Seguido da quantidade em GAGs obtida de gônada ($0,40 \pm 0,08\%$) e intestino ($0,36 \pm 0,10\%$) ($p > 0,05$) de Tilápia, considerando Nogueira *et al.* (2019) que obtiveram, com este mesmo protocolo de extração, GAGs de vísceras deste peixe; enquanto em olho a quantidade de GAGs foi a menor obtida ($0,16 \pm 0,03\%$), porém similar à encontrada em córnea bovina (SILVA, 2018), como também mostra a Tabela 1.

Quanto à pele ($0,18 \pm 0,02\%$) o rendimento bruto em GAGs foi ainda equivalente ao de olho ($p > 0,05$), com base em estudos anteriores que obtiveram rendimentos de GAGs variando de 0,09 a 0,22% (RODRIGUES *et al.*, 2011b; SALLES *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2021), a partir de amostras de pele, digeridas com papaína, de Tilápia cultivada em sistema tanque-rede ou tanque-de-alvenaria, revelando conteúdo baixo de mucopolissacarídeos na pele deste peixe independente do sistema de cultivo empregado (MOREIRA *et al.*, 2001) e segundo outros autores citados na Tabela 1 quando comparando-se GAGs obtidos de outras fontes animais usando diferentes protocolos.

Desta forma, a abundância de GAGs varia com a espécie e resíduo, estágio de desenvolvimento e grupos (PFEILER, 1998; JRIDI *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2019), origem animal – vertebrado e invertebrado (REGNAULT; DURAND, 1998; VOLPI; MACCARI, 2002) e/ou metodologia aplicada na obtenção desses compostos (RODRIGUES *et al.*, 2009; ARIMA *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017; JRIDI *et al.*, 2019).

3.3 Análise metacromática preliminar de sulfatação

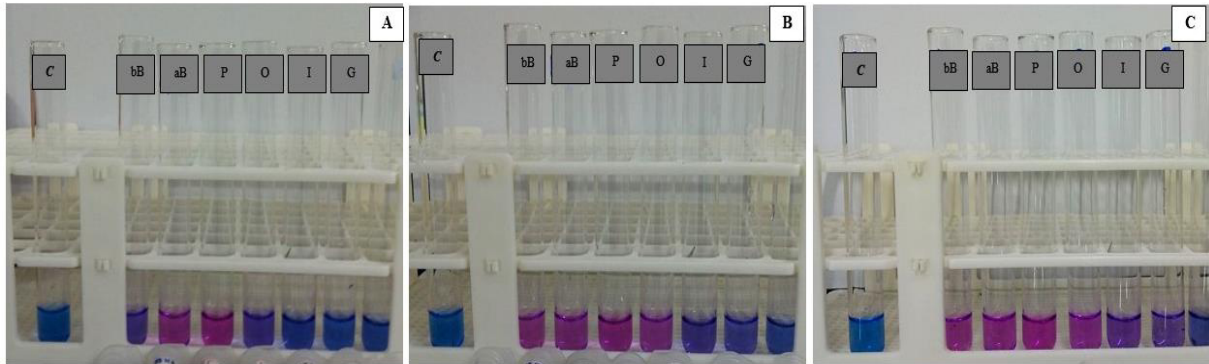
A realização do ensaio de metacromasia, a partir dos extratos brutos derivados dos diferentes resíduos removidos de Tilápia, revelou preliminarmente materiais sulfatados quando na presença de azul 1,9-dimetilmetileno como indicador específico de reação colorimétrica, como mostrada na Figura 11.

Diante dos resultados encontrados, observou-se uma propriedade violeta (metacromasia) de composição variando entre as amostras de GAGs avaliadas provenientes dos diferentes resíduos e com intensidade aumentando dependendo da quantidade crescente de amostra aplicada ($9\mu\text{g}$, $18\mu\text{g}$ e $27\mu\text{g}$) na presença do corante no decorrer do ensaio, postulando que cada resíduo apresentou propriedade aniônica (sulfatação) particular (FARNDAL; SAYERS; BARRETT, 1982; FARNDAL; BUTTLE; BARRET, 1986).

Os GAGs obtidos de arco branquial e pele sugeriram, visualmente, maiores graus de sulfatação (Figura 11A), enquanto base branquial e olho requereram uma quantidade de amostra de GAGs duas vezes a mais para apresentar o complexo de coloração violeta (Figura 11B). Para

intestino e gônada, por sua vez, a quantidade de amostra foi ainda três vezes maior para desencadear um caráter aniônico, embora discreto na reação, conforme Figura 11C.

Figura 11 – Metacromasia dos GAGs brutos, por resíduo, de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A- 9µg de GAGs; **B-** 18µg de GAGs e **C-** 27µg de GAGs.

C- Controle DMB; **bB-** base branquial; **aB** - arco branquial; **P-** pele; **O** - olho; **I** - intestino e **G** - gônada.

Fonte: Autora (2021).

Esses perfis de análise metacromática combinados sinalizam que a composição de sulfato nessas moléculas poderia ser heterogênea (SOUZA *et al.*, 2007) e observada, preponderantemente, em resíduos de maior disponibilidade de massa desidratada (Gráfico 1).

3.4 Caracterização físico-química dos GAGs

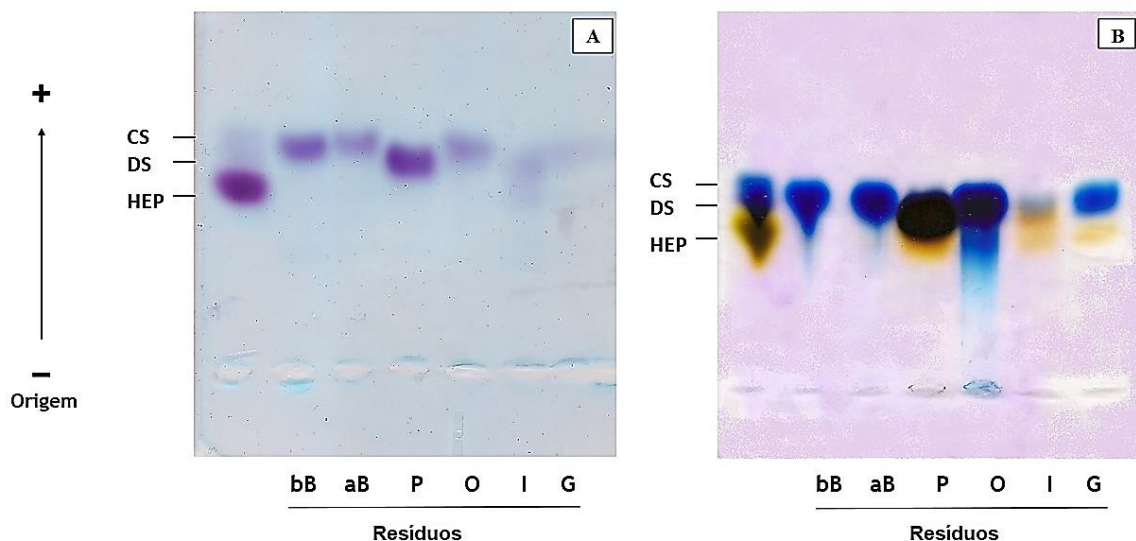
A análise por metacromasia (Figura 11) indicou que todas as amostras de GAGs brutos dos resíduos de Tilápia do Nilo apresentaram sulfatação, submetidas às próximas metodologias, foram parcialmente, identificadas quanto aos padrões e densidades de carga por mobilidade eletroforética em gel de agarose e quanto à distribuição de peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida, comparando-se aos padrões de GAGs.

3.4.1 Caracterização por eletroforese em gel de agarose

O perfil eletroforético em gel de agarose (0,5%) confirmou a propriedade metacromática, anteriormente verificada na Figura 11, nas amostras contendo GAGs brutos, obtidos dos diferentes resíduos avaliados de Tilápia, por meio da caracterização violeta

produzida pelas bandas visualizadas após contato com o corante catiônico azul de toluidina. Por outro lado, pela interação dos GAGs com a diamina do sistema tampão empregado (DIETRICH; DIETRICH, 1976), verificou-se, em geral, bandas homogêneas únicas com mobilidades distintas no gel e diferentes entre si quanto à densidade de cargas negativas (Figura 12A), pressupondo entre as amostras avaliadas GAGs com diferenças marcantes quanto à presença de radicais sulfatos nas estruturas químicas destes polímeros (RODRIGUES *et al.*, 2009; SALLES *et al.*, 2017; NOGUEIRA *et al.*, 2019; MOURA *et al.*, 2021).

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose (0,5%) dos GAGs, por resíduo, de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A - GAGs de resíduos e padrões corados com azul de toluidina a 0,1%. **B** - Corados com "stains-all".

Resíduos: **bB**- base branquial; **aB**- arco branquial; **P**- pele; **O**- olho; **I**- intestino e **G**- gônada.

Padrões: **CS**- condroitim sulfato; **DS**- dermatam sulfato e **HEP**- heparina.

Fonte: Autora (2021).

Como observado, GAGs de brânquia comigraram como CS padrão e, mais revelante, com banda metacromática única de maior intensidade para base branquial, sugerindo concentração importante em GAGs sulfatados nesta região deste resíduo do que no arco branquial deste peixe. Essa diferença físico-química de localização molecular na estrutura branquial de *O. niloticus* pode ser o resultado de GAGs ocorrendo em níveis distintos de sulfatação como encontrado em guelras de Carpa comum (*C. carpio*) nas quais identificou-se CS neste resíduo (WASSERMAN; BER; ALLALOUF, 1972).

A pele de Tilápia mostrou, no gel, banda homogênea de revelação metacromática intensa do extrato bruto avaliado comigrando ao DS de mamífero padrão, já presumido na matriz deste resíduo, segundo estudos anteriores (RODRIGUES *et al.*, 2011b; SALLES *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2021). Em peixes marinhos, o DS é o GAG preponderante na pele, como no tubarão azul (*Prionace glauca*) (NANDINI *et al.*, 2005) e nas raias *Dasyatis amaricana*, *D. gutatta*, *Aetobatus narinari* e *Potamotrygon motoro* (DELLIAS *et al.*, 2004).

Considerando olho e intestino, observou-se GAGs com revelação menor em termos de densidade de cargas em ambas as amostras avaliadas, diante de um perfil eletroforético ainda polidisperso, especialmente para este segundo resíduo, sugerindo a presença de GAGs CS/DS e DS/HS, respectivamente.

Silva (2018) descreveu ocorrência de DS, QS e AH na córnea bovina, enquanto CS/DS/HS foram identificados em vísceras de Tilápia segundo Nogueira *et al.* (2019). Em intestino do atum-rabilho do Pacífico (*Thunnus orientalis*), Arima *et al.* (2013) encontraram quantidades importantes de GAGs CS, DS e AH neste resíduo. Portanto, esses estudos apontaram que, nestas estruturas, distintos GAGs ocorreram em mistura considerando a fonte animal.

Quanto à gônada masculinizada de Tilápia, sugeriu-se banda única discreta de DS, sendo o primeiro relato quanto à caracterização físico-química de GAGs neste órgão. Segundo a literatura, não há descrição ou evidências de funcionalidades de GAGs em estruturas reprodutivas de peixes, diferentemente, nos mamíferos os quais estão envolvidos no ciclo reprodutivo e durante a gravidez (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

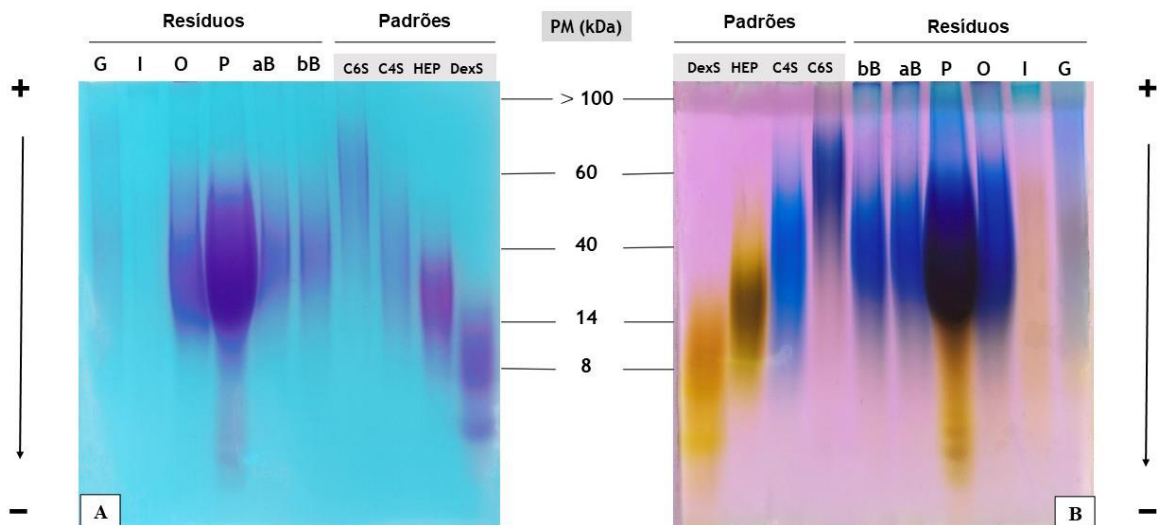
A análise eletroforética do gel corado com "stains-all" somente (Figura12B) permitiu uma caracterização físico-química mais abrangente das diferentes amostras obtidas. Bandas revelaram-se com visualização mais intensa, com mistura ou não de GAGs, bem como os padrões de GAGs CS, DS e HEP utilizados separadamente, devido ao fato da composição desses GAGs, rica em açúcares acídicos não sulfatados (ácido D-glucurônico ou L-idurônico), cujo corante catiônico "stains-all" atuaria com maior detecção sobre os resíduos carboxilados, formando complexos e identificando por meio de cor a depender do tipo de GAG, ou seja, composição e estrutura espacial (VOLPI; MACCARI, 2002). Esse procedimento único de revelação permitiu observar preliminarmente, em especial, no intestino e gônada, dois componentes migrando distintamente no gel, nas cores azul (superior) e amarelo/marrom (inferior), pressupondo DS/CS/HS nestes resíduos frente aos padrões utilizados. Outra observação foi a possível presença de AH coextraído com outros GAGs, na cor ciano, para alguns dos resíduos (olho, intestino e gônada) avaliados neste estudo, já que tal GAG é

destituído de sulfatação (OLIVEIRA *et al.*, 2015) e pode ocorrer em tecidos de peixes (SOUZA *et al.*, 2007; MANSOUR *et al.*, 2009), desde que tratamento único com azul de toluidina não revela polissacarídeos não-sulfatados (VOLPI; MACCARI, 2002).

3.4.2 Caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida

O uso da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida caracterizou as amostras de GAGs, dos diferentes resíduos de Tilápia do Nilo, como sistemas heterogêneos típicos (SOUZA *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2017; SALLES *et al.*, 2017), baseado na distribuição variável entre os pesos moleculares dos GAGs em uma amplitude de ~8 kDa a valores > 100 kDa considerando-se os padrões utilizados, após revelação com ambos os corantes catiônicos (Figura 13).

Figura 13 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) dos GAGs, por resíduo, de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



A - GAGs de resíduos e padrões corados com azul de toluidina a 0,1%. **B** - Corados com "stains-all".

Resíduos: **bB**-base branquial; **aB**- arco branquial; **P**- pele; **O**- olho; **I**- intestino e **G**- gônada.

Padrões: **DexS**- dextrana sulfatada; **HEP**- heparina; **C4S**- condroitim-4-sulfato; **C6S**- condroitim-6-sulfato.

Fonte: Autora (2021).

No tratamento com azul de toluidina (Figura 13A), GAGs assumiram no gel em poliacrilamida uma diferença também importante quanto à propriedade aniônica, especialmente

para as amostras brutas extraídas de intestino e gônada que praticamente não apareceram em agarose, como anteriormente observado (Figuras 11 e 12A). Essa diferença, no entanto, não se refletiu na mobilidade eletroforética das várias amostras avaliadas apresentando perfis semelhantes entre si, cujos pesos moleculares foram aparentes ao do CS padrão possuindo ~ 40 kDa.

Resultados sugerem, em geral, a presença preponderante de GAGs de peso equivalente entre os diferentes resíduos examinados, como no DS da pele caracterizado, parcialmente, por Salles *et al.* (2017).

Tendo em vista a análise em gel de agarose da Figura 12B, a identidade particular dos GAGs extraídos de Tilápia foi ainda avaliada em gel de poliacrilamida (Figura 13B), após tratamento com "stains-all", no intuito de detectar com mais propriedade compostos em mistura e possíveis contaminantes (ANDRADE *et al.*, 2017).

Assim, como demonstrado, distintamente, para os padrões, os diferentes resíduos de Tilápia revelaram GAGs de visualização mais intensa e variante no código de cores, onde as preparações de brânquia, pele e olho indicaram preponderância de azul na porção central do gel, característico ao C4S bovino, além de DNA e proteínas contidas possivelmente nestas amostras, cujos contaminantes sugeriram no topo do gel por meio das cores azul e azul/vermelho ou rosa, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2017), já que na matriz extracelular os GAGs são encontrados complexados às proteínas, formando proteoglicanos (OLIVEIRA *et al.*, 2015), além da metodologia aplicada neste trabalho semelhante para coisolar DNA (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Bandas proteicas características em amarelo/vermelho/marrom foram ainda mostradas na amostra de pele com mais propriedade e detectadas também na parte inferior do gel (Figura 13B), o que denota na referida amostra uma peculiaridade dos indivíduos utilizados, contrapondo ao demonstrado por Salles *et al.* (2017) que observaram maior grau de pureza, por eletroforese, em frações do material extraído da pele de Tilápia, isentas de qualquer perfil proteico, embora empregando a combinação de ambos os corantes para revelação de GAGs.

As bandas diferentes em peso molecular ainda verificadas na Figura 13B podem indicar a presença de peptídeos ligados às cadeias de GAGs nestes resíduos, como resultado de uma degradação proteolítica ineficaz da estrutura complexa de proteoglicanos presente na matriz, como demonstrado para GAGs extraídos de pele suína e córnea bovina (SILVA, 2018).

Observação de dois componentes distintos em cor no gel, como já visualizado por agarose (Figura 12B), coextraídos do intestino, após revelação com o respectivo corante, sendo o primeiro de peso molecular > 100 kDa visualizado em cor ciano no topo do gel, característico

para AH; e outro de cores amarelo e marrom apresentando comportamento eletroforético com distribuição de pesos moleculares correspondentes a dextrana sulfatada (~8kDa) e ao CS (~60 kDa), especulando a presença de HS e DS migrando concomitantemente, baseado em Andrade *et al.* (2017).

De maneira similar ocorreu no resíduo gônada apresentando um sistema complexo de cores variantes na amostra avaliada, embora sem separação clara de pesos moleculares. Esses resultados combinados sugeriram GAGs e contaminantes em mistura nestes resíduos que se distinguiram, tanto pela revelação de cor como por peso molecular, quando comparados aos padrões de GAGs utilizados.

Portanto, tais técnicas eletroforéticas, quando combinadas para separação molecular, sugeriram como ferramentas auxiliares para estudos de composição bioquímica, análise de pureza e identificação de contaminantes presentes em preparações de GAGs extraídos de resíduos de Tilápia. Segundo Volpi e Maccari (2002), a HEP é comumente coisolada com quantidades variantes de outros GAGs a partir de tecidos bovino e suíno. Esse fato acarreta baixo grau de pureza nas preparações comerciais de HEP, necessitando de um rigoroso controle de qualidade para seu uso clínico (MELO *et al.*, 2008).

3.5 Análise espectral de IV dos GAGs de resíduos de Tilápia

A caracterização espectroscópica de IV na região de 4000 a 500 cm^{-1} ofereceu informações relevantes dos grupos funcionais presentes nas diferentes amostras obtidas de carboidratos, bem como permitiu comparar os vários resíduos de Tilápia em termos de composição e biologia estrutural de GAGs.

Os espectros estão ilustrados na Figura 14 e os valores de absorvância listados na Tabela 2. Desta forma, observou-se bandas comuns de amins, cujos sinais foram de 3398 a 3431 cm^{-1} , para amina A, de 1622 a 1649 cm^{-1} , para amina-I, de 1552 a 1560 cm^{-1} , para amina-II (JRIDI *et al.*, 2019) com grupos hidroxil (-OH) presentes (DHAHRI *et al.*, 2010).

Ademais, regiões variando de 2918 a 2924 cm^{-1} indicaram absorções químicas de C-H do anel, típicas de ligações glicosídicas (DHAHRI *et al.*, 2020); e as vibrações de 1375 a 1379 cm^{-1} e de 1409 a 1454 cm^{-1} deduziram picos relacionados à presença de ácidos urônicos nas amostras avaliadas, bem como ciclos osídicos C-O-C, C-OH e C-C (1066-1141 cm^{-1}) (JRIDI *et al.*, 2019; DHAHRI *et al.*, 2010 e 2020).

Segundo a Figura 14, as amostras analisadas por IV mostraram estruturas diferentes e confirmaram ainda a ocorrência de grupos sulfatados, especialmente nas regiões de estiramento químico de 1238 a 1244 cm^{-1} (S=O), típicos para GAGs sulfatados (JRIDI *et al.*, 2019; DHAHRI *et al.*, 2010 e 2020).

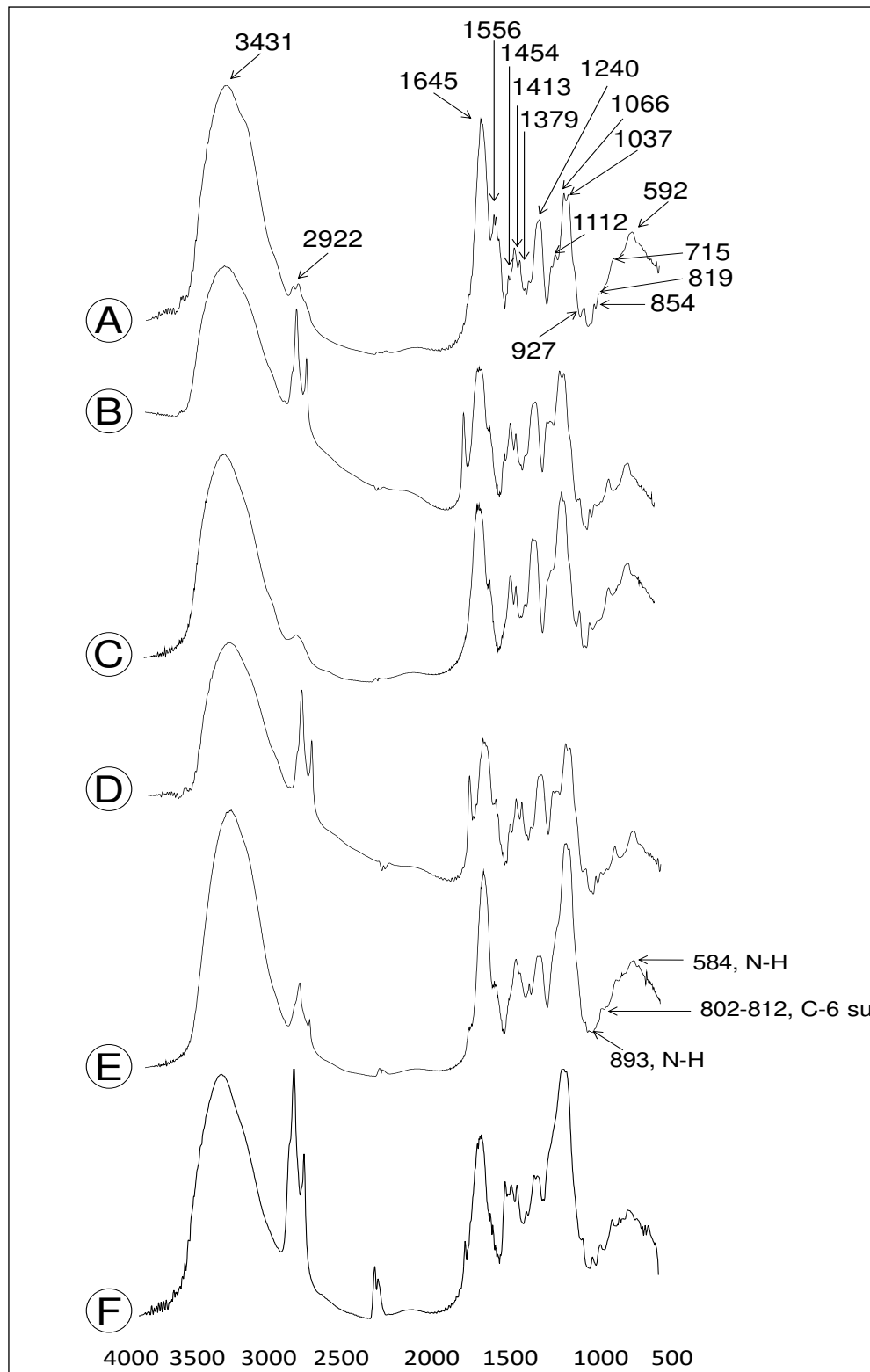
Absorções químicas de 1409 a 1417 cm^{-1} e de 1556 a 1560 cm^{-1} indicaram, respectivamente, a presença de C–N e N–H nas estruturas dos polímeros extraídos dos resíduos de Tilápia (OLIVEIRA *et al.*, 2017; DHAHRI *et al.*, 2010 e 2020). Tais sinais espectrais levaram a existência de grupos sulfatos substituídos nas regiões 819 cm^{-1} (C–O–S, sulfato da posição no C–6) e 854 cm^{-1} como pico característico de sulfato ocupando o C–4 (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Brânquia revelou pico de sulfatação de maior intensidade para os GAGs extraídos de sua base do que daqueles obtidos da estrutura de arco comparando as respectivas regiões de vibração (1240 e 1238 cm^{-1} , respectivamente, Figuras 14A e 14B) e justificaram a diferença marcante observada na densidade de cargas destes compostos por eletroforese (Figura 12A).

A presença de absorbâncias em 819 e 821 cm^{-1} , assim como em 854 e 856 cm^{-1} , indicam sulfatação nos C–6 e C–4 nas posições equatoriais e axiais, respectivamente (OLIVEIRA *et al.*, 2017), bem como as regiões de 1556 a 1560 cm^{-1} e de 1413 a 1415 cm^{-1} representativas de resíduos de hexosamina (galactosamina) acetilada (DHAHRI *et al.*, 2010 e 2020) e COO do ácido glucurônico (WU; XU; DING, 2010), respectivamente (Tabela 2), do GAG CS ocorrendo em toda estrutura branquial como presumido físico-quimicamente (Figura 12A e Figura 13A).

Os sinais característicos, na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} sugerem ubiquidade de GAGs C4S e C6S em brânquia e mistura de GAGs em pele, olho, gônada (C4S, C6S, DS e AH) e em intestino (AH, DS e HS) como pode ser visto na Figura 14.

Figura 14 – Espectros de IV dos GAGs, por resíduos, obtidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em 4000 a 500 cm^{-1} .



A - arco branquial; B - base branquial; C- pele; D - olho; E- intestino e F -gônada.

Fonte: Autora (2021).

Tabela – 2 Sinais de IV presumidos para GAGs brutos extraídos de diferentes resíduos removidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

Sinal espectral (cm ⁻¹)	Grupo químico	Referência
3398 a 3431	Amida A, –OH	Jridi <i>et al.</i> (2019), Dhahri <i>et al.</i> (2010) e Pereira <i>et al.</i> (2021)
1622 a 1649	Amida-I, –OH	Jridi <i>et al.</i> (2019), Dhahri <i>et al.</i> (2010) e Pereira <i>et al.</i> (2021)
1552 a 1560	Amida-II, –OH	Jridi <i>et al.</i> (2019) e Dhahri <i>et al.</i> (2010)
2918 a 2929	C–H	Dhahri <i>et al.</i> (2020) e Pereira <i>et al.</i> (2021)
1556 a 1560	N–H N-acetil galactosamina	Oliveira <i>et al.</i> (2017) e Dhahri <i>et al.</i> (2010 e 2020)
1238 a 1244	S=O	Oliveira <i>et al.</i> (2017), Jridi <i>et al.</i> (2019) e Dhahri <i>et al.</i> (2010 e 2020)
1375 a 1379	Ácidos urônicos	Jridi <i>et al.</i> (2019), Dhahri <i>et al.</i> (2010) e Oliveira <i>et al.</i> (2017),
1409 a 1454	C–N, ácidos urônicos C–O, N–H COO ⁻ do ácido glucurônico	Jridi <i>et al.</i> (2019), Dhahri <i>et al.</i> (2010 e 2020) e Wu <i>et al.</i> , (2010)
1052-1141	C–O–C, C–OH e C–C	Jridi <i>et al.</i> (2019), Dhahri <i>et al.</i> (2010 e 2020) e Pereira <i>et al.</i> (2021)
854-856	C–O–S	Oliveira <i>et al.</i> (2017) e Pereira <i>et al.</i> (2021)
819-821	C–O–S	Oliveira <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Autora (2021).

Portanto, resíduo brânquia consistiu de ambos CSs formando a cadeia principal, como também encontrado no resíduo osso deste mesmo peixe (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Fato revelou que tal GAG, aparentemente, não está distribuído de maneira homogênea entre as diferentes estruturas anatômicas da brânquia (Gráfico 2).

A análise dos GAGs de pele mostrada na Figura 14C indicou valores espectrais em 1559 (C=O, compatível à grupos acetatos que ocorrem em resíduos de galactosamina), 1411, 1376 (O-C=O, ácido urônico), 1052 (C-O-C, ciclo osídico), 2929 (-CH₂), 1252, 925 (-SO³), 856 (C4S) cm⁻¹ (DHAHRI *et al.*, 2010), confirmando que o GAG presente neste resíduo ocorre na forma de cadeia híbrida (CS/DS) segundo Pereira *et al.* (2021).

O espectro de IV para a amostra bruta de GAGs extraídos da estrutura ocular está mostrada na Figura 14D e revelou grupos carboxílicos (1409, COO⁻; 1315, C-O-C; 1379, C-H; 1552, C-N com acetil galactosamina) e sulfatos (1244, -SO³; 1064, S=O; 812 cm⁻¹, C-O-S, sulfato na posição axial) caracterizando um DS comparando à córnea bovina (SILVA, 2018), além de AH, como componente importante do corpo vítreo dos olhos (OLIVEIRA *et al.*, 2015), devido à presença de carbonila e N-acetil, portanto, apoiando a revelação polidispersa no gel de agarose com "stains-all" da Figura 12B, baseado em Rosa *et al.*, (2008) avaliando AH coextraído da crista de frango.

Os resíduos removidos da cavidade abdominal (intestino e gônada) mostraram-se de interpretação espectral bastante complexa, como previsto pelos perfis eletroforéticos combinados, especialmente quando os GAGs foram revelados com "stains-all" (Figuras 12 e 13). Amostras de GAGs destes resíduos (Figuras 14E e 14F) mostraram intensidades menores de absorvância que das partes externas removidas de Tilápia, exceto nas regiões relativas à amina A (3398 e 3427 cm⁻¹), amina-I (1622-1629 cm⁻¹) e ciclo osídico (1062-1064 cm⁻¹) que apresentaram proporções importantes de grupos funcionais de resíduos de açúcares aminados (-N) e ácidos, além dos sinais em 1409 e 1417 cm⁻¹ sugerindo COO⁻ do ácido glucurônico nas amostras avaliadas, indicando também a presença de AH e reforçando a cor ciano a partir das amostras caracterizadas anteriormente por gel de poliácridamida (Figura 13B).

Em intestino, bandas de absorção típicas de HS foram ainda observadas nas regiões amins correspondentes a 584, 802 e 893 cm⁻¹ (COELHO, 2004), além de quantidades ínfimas de DS diante do alongamento espectral observado entre 800 a 812 cm⁻¹, visto na Figura 14E (DHAHRI *et al.*, 2010 e 2020).

Gônada (Figura 14F) revelou, em geral, características estruturais similares às apontadas para os GAGs de intestino, porém incluindo GAG C-4/-6-S (802 e 856 cm⁻¹) ocorrendo assim, ambos os tipos, também neste resíduo (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Resultados combinados nesta pesquisa vem mais uma vez ao encontro de Nogueira *et al.* (2019) que revelaram tais GAGs em vísceras de Tilápia, exceto AH, embora os autores do estudo tenham analisado estruturalmente os GAGs por ressonância magnética nuclear.

Outros sinais observados nos espectros de IV revelados na Figura 14 deste estudo foram atribuídos a impurezas presentes nos diferentes materiais extraídos de Tilápia.

O uso de técnicas bioquímicas combinadas a estudos estruturais, sobretudo, avalizou o perfil molecular nos diferentes resíduos considerados de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*), revelando um cenário de composição complexa e heterogênea dentre os variados aspectos morfológicos deste teleósteo.

Assim, análises conjuntas desta pesquisa indicaram preponderância de GAGs DS e CS ou como cadeias, constituindo os resíduos orgânicos de contato externo ao peixe em relação aqueles de cavidade abdominal mostrando mistura complexa em GAGs (DS, CS, AH e HS).

Claramente, pelos métodos bioquímicos utilizados, os resultados apontaram que disponibilidade, grau de pureza e identidade química de GAGs variou entre os resíduos avaliados individualmente.

A composição de GAGs entre regiões bastante distintas na Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) sinaliza como biomarcadores importantes para estudos subsequentes de evolução química e função biológica associados a investigações histológicas combinadas aos caracteres morfológicos (PFEILER, 1998; SOUZA *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009).

3.6 Atividade antioxidante *in vitro* de GAGs de base branquial de Tilápia

A mensuração da atividade antioxidante dos GAGs extraídos de base branquial desidratada de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*), que apresentaram ubiquidade e maior pureza, foi realizada por meio de três ensaios *in vitro*, utilizando-se concentrações de 0,125 a 4,0 mg/mL, cujos resultados são discutidos a seguir.

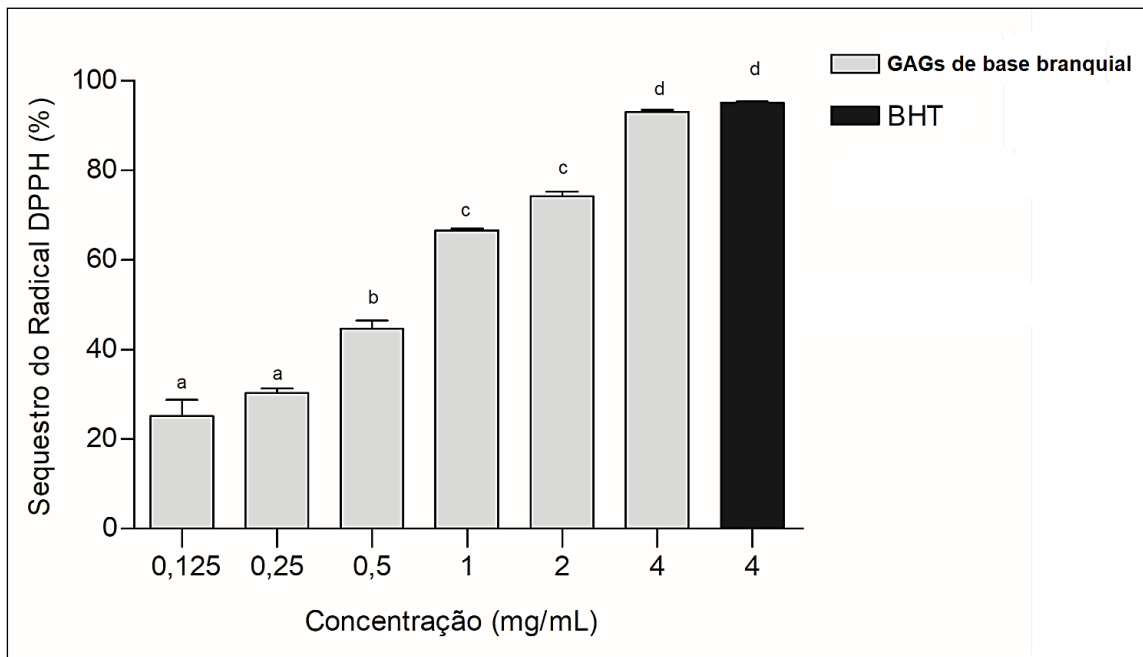
3.6.1 Sequestro do Radical DPPH

O método da eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) é amplamente utilizado para a determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras e misturas (OLIVEIRA, 2015). DPPH é um radical orgânico livre e estável que se liga a radicais livres devido à presença de uma superfície doadora de prótons, inibindo, desta forma, a formação de processos oxidativos nos tecidos dos organismos (YE *et al.*, 2011).

Os resultados expostos no Gráfico 3 mostraram que os GAGs obtidos de base branquial de *O. niloticus* apresentaram atividade antioxidante *in vitro*, pelo sequestro do radical DPPH, dependente da concentração.

Desta forma, a atividade antioxidante dos GAGs da base branquial apresentaram taxas de sequestro discretas com 0,125 e 0,25 mg/mL ($25,13 \pm 3,66$ e $30,31 \pm 0,95\%$, respectivamente, $p > 0,05$), enquanto efeitos redutores mais importantes foram observados nas concentrações maiores de GAGs, de tal forma que o potencial de eliminação do radical DPPH foi equivalente ($p > 0,05$) à atividade do controle positivo BHT ($95,68 \pm 0,28\%$; 4 mg/mL) na maior concentração testada da amostra ($93,14 \pm 0,38\%$), como é mostrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Sequestro do radical DPPH (%), *in vitro*, dos GAGs obtidos da base branquial de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Letras diferentes indicam diferença estatística entre colunas (ANOVA, Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 3$).

Fonte: Autora (2022).

Este estudo revelou GAGs da base branquial de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) como agentes antioxidantes *in vitro* de maior potencial que a de outras fontes aquáticas possuindo GAGs antioxidantes. Por exemplo, segundo estudo realizado por Abdelmalek *et al.* (2015), os autores extraíram GAGs da pele da lula comum *Loligo vulgaris* e encontraram uma taxa inibitória de sequestro de DPPH significativa somente acima de 50% quando em concentração elevada de amostra (19,42 mg/mL). GAGs extraídos de pele e músculo da lula *Sepia officinalis* Jridi *et al.* (2019) verificaram potenciais máximos de redução do radical DPPH nas concentrações de 3 e 5 mg/mL, com níveis inibitórios de 60 e 65%, respectivamente. Mais recentemente, Nascimento *et al.* (2021) avaliaram a ação *in vitro* da capacidade de sequestro do radical DPPH por GAGs extraídos da pele de *O. niloticus* e obtiveram uma redução modesta do processo oxidativo em, no máximo, $30,26 \pm 2,80\%$ quando na concentração de 4,0 mg/mL, cujo efeito foi 3,16 vezes inferior ao comparado a este estudo (Gráfico 3).

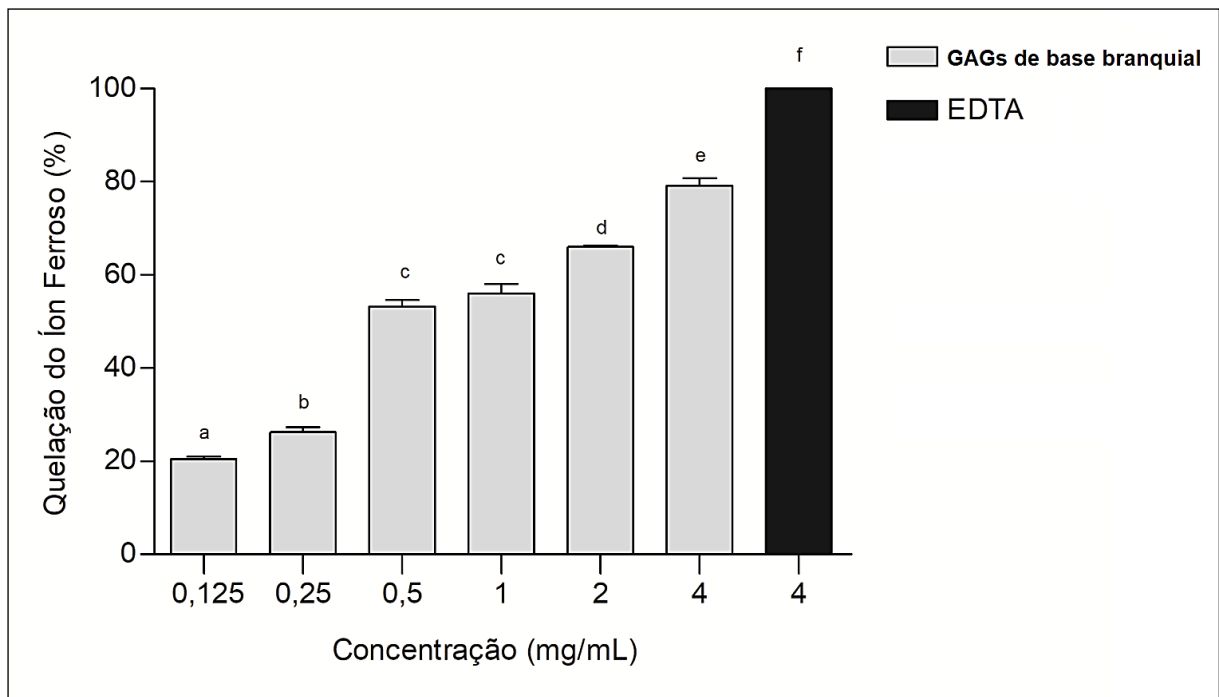
3.6.2 Quelação do íon ferroso

A presença de metais de transição em sistemas biológicos pode catalisar reações de Haber-Weiss e de Fenton gerando radicais hidroxila (HO^-) reativos (CHEW *et al.*, 2008). Os antioxidantes são espécies químicas capazes de quelar esses metais de transição, resultando na supressão da geração de HO^- e inibição do processo de peroxidação de moléculas biológicas (CHEW; GOH; LIM, 2009).

Os GAGs obtidos da base branquial de *O. niloticus* apresentaram habilidade de quelação do íon ferroso (Fe^{+2}), dependente da concentração, de acordo com o Gráfico 4.

O efeito de quelação do íon ferroso (Fe^{+2}) mostrou-se modesto, porém significativo, entre as concentrações 0,125 e 0,25 mg/mL ($20,46 \pm 0,56$ e $27,68 \pm 1,10\%$, respectivamente). E, mais que dobrando com 0,5 e 1 mg/mL de GAGs ($53,19 \pm 1,42$ e $56,02 \pm 2,12\%$, respectivamente, $p > 0,05$); em concentrações maiores (2 e 4 mg/mL) apresentando taxas não superiores a 80% da habilidade de quelação, cujo potencial foi significativamente inferior ao EDTA ($97,12 \pm 0,56$; 4 mg/mL) usado como controle positivo, como pode ser observado no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Quelação do íon ferroso (%), *in vitro*, dos GAGs, obtidos da base branquial de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Letras diferentes indicam diferença estatística entre colunas (ANOVA, Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 3$).

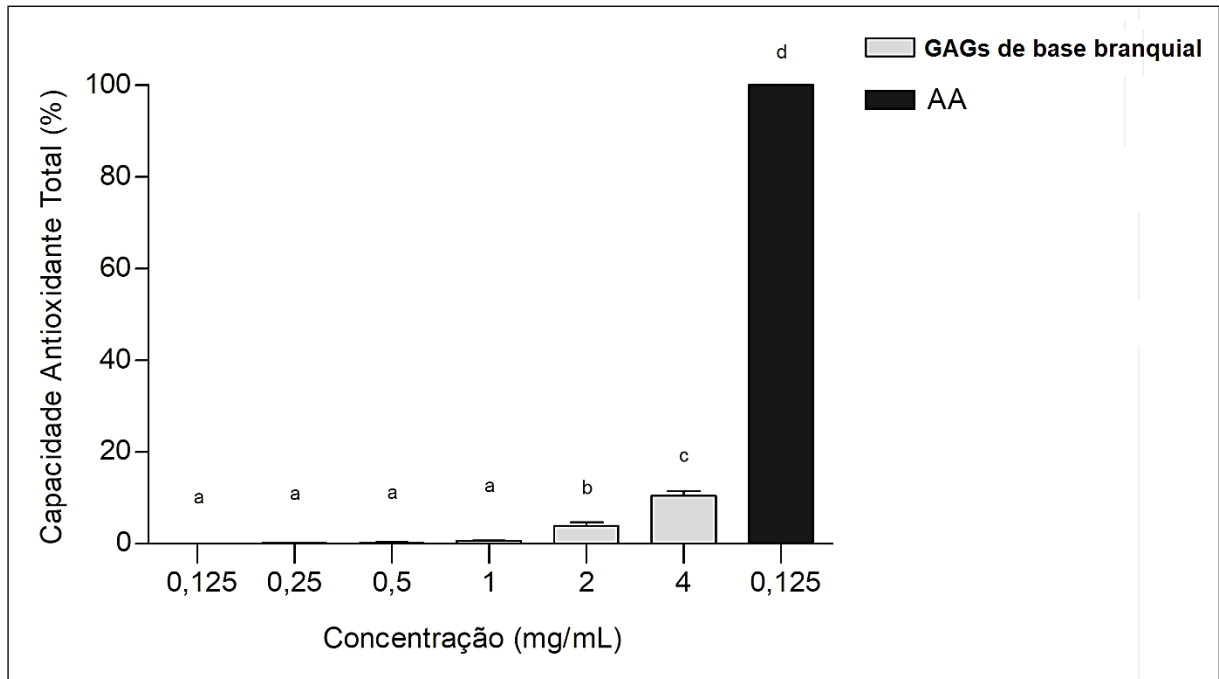
Fonte: Autora (2022).

Esta pesquisa apontou que GAGs da base branquial de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) também possuem interessante efeito quelante de inibição do íon ferroso. Namasivayam *et al.* (2014) obtiveram da concha do molusco *S. aculeata*, polissacarídeos sulfatados com um máximo de 48,61% de ação quelante para 10 mg/mL. Bai *et al.* (2018), investigando frações de GAGs obtidas da pele da serpente marinha *Lapemis curtus*, alcançaram nível máximo de quelação do íon ferroso com média de 93,7% em 3,2 mg/mL. Nascimento *et al.* (2021), ao analisarem GAGs extraídos da pele de *O. niloticus*, atingiram o máximo de efeito quelante, com inibição de $32,22 \pm 0,10\%$ para 2,0 mg/mL e $31,10 \pm 0,59\%$ para 4,0 mg/mL, sendo estes efeitos 2,7 e 2,8 vezes inferiores quando comparados a esta pesquisa para, respectivamente, 2,0 e 4,0 mg/mL de amostra (Gráfico 4).

3.6.3 Capacidade antioxidante total

Os valores referentes à capacidade antioxidante total dos GAGs extraídos de base branquial de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) estão registrados no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Capacidade antioxidante total (%), *in vitro*, dos GAGs obtidos da base branquial de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



Letras diferentes indicam diferença estatística entre colunas (ANOVA, Teste de Bonferroni, $p < 0,05$).

Os dados são expressos como média \pm desvio-padrão ($n = 3$).

Fonte: Autora (2022).

Os GAGs da base branquial de *O. niloticus* exibiram uma discreta redução de reação oxidante, cujos efeitos *in vitro* não atingiram 20% de inibição da capacidade antioxidante total, mesmo utilizando concentrações mais elevadas de amostra (2 e 4 mg/mL) frente ao potencial apresentado pelo ácido ascórbico (AA), que em apenas 0,125 mg/mL exerceu 100% de eliminação do processo oxidativo *in vitro*.

As observações deste estudo, quanto à capacidade antioxidante total, mostraram um potencial comparativamente menor do que outras fontes ricas em polissacarídeos sulfatados, como no estudo de Souza *et al.* (2016), cujos autores obtiveram, a uma concentração de 4 mg/mL, uma atividade antioxidante máxima de 62,46% dos polissacarídeos sulfatados

extraídos da alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. Segundo Bai *et al.* (2018), utilizando-se deste mesmo teste antioxidante, observaram um nível máximo de capacidade *in vitro* de 57,8% em 6,4 mg/mL, para os GAGs extraídos da serpente marinha *Lapemis curtus*. Jridi *et al.* (2019) revelaram que GAGs extraídos da pele e músculo da lula *Sepia officinalis* exibiram capacidade de ação máxima superior a 90% com 1 mg/mL. Diferentemente de tais estudos, Nascimento *et al.* (2021) encontraram uma capacidade antioxidante total de apenas $25,21 \pm 0,64\%$ em 4 mg/mL de GAGs extraídos da pele de Tilápia (*O. niloticus*), sendo essa propriedade a menor obtida dentre os três ensaios *in vitro* utilizados, assim como, no presente estudo (Gráfico 5).

Por meio da avaliação conjunta dos três ensaios *in vitro* da atividade antioxidante dos GAGs extraídos da base branquial de *O. niloticus*, foi possível averiguar efeitos importantes destes compostos no sequestro e quelação. Estes papéis, ainda que preponderante o primeiro, deduziram a participação de múltiplos sítios ativos nesses processos, diferente do observado para GAGs da pele, desta mesma espécie de peixe, que apresentaram interação maior com o ferro (NASCIMENTO *et al.*, 2021), postulando inibição da produção de radicais hidroxil no sistema (ALENCAR *et al.*, 2019).

A combinação desses estudos mostrou explicitamente a evidência de que a heterogeneidade dessas moléculas reflete na ação antioxidante segundo, ainda, outros autores (NAMASIVAYAM *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2016; BAI *et al.*, 2018), em que os radicais sulfatos, presentes nas estruturas químicas destes polímeros, podem estar relacionados ao efeito de quelação, sequestro ou habilidade doadora de elétrons de GAGs antioxidantes (JRIDI *et al.*, 2019).

Considerando que a Tilápia do Nilo possui importante valor de mercado e o seu aproveitamento integral pode contribuir como fonte importante de produtos biotecnológicos socialmente, ambientalmente e economicamente sustentáveis (MOREIRA *et al.*, 2001), esta pesquisa revelou em resíduo da base branquial de *O. niloticus* GAGs antioxidantes capazes de combater radicais livres conhecidos por causarem complicações cardiovasculares e câncer (CHAÚ; BEZERRA, 2021).

4 CONCLUSÃO

Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) gerou um volume de resíduos desidratados de maior rentabilidade das partes removidas da anatomia externa (brânquia, pele e olho) em relação às quantidades obtidas da sua cavidade interna (intestino e gônada).

Brânquia – base e arco, por digestão enzimática, foi a fonte principal em glicosaminoglicanos, tal que arco branquial deteve, aproximadamente, o triplo da quantidade da base. Seguido dos glicosaminoglicanos de gônada e intestino, enquanto em olho, a menor quantidade desses compostos, porém equivalente aos presentes na pele.

Análise metacromática dos extratos brutos, em corante azul 1,9-dimetilmetileno, indicou sulfatação. Porém, a propriedade variou entre as amostras consideradas, de tal forma que arco branquial e pele sugeriram composição maior que na base branquial e olho e, com menor sulfatação, para intestino e gônada. Assim, a composição de sulfatação foi heterogênea e observada, preponderantemente, em resíduos de maior rendimento de massa desidratada.

Técnicas eletroforéticas (agarose e poliacrilamida) combinadas revelaram glicosaminoglicanos sulfatados homogêneos ou não, de pesos moleculares, em geral, similares ao condroitim sulfato (~ 40 kDa), após azul de toluidina, indicando condroitim (brânquia – arco e base, olho e gônada), dermatam (pele, intestino e gônada) e heparam (intestino e gônada). Ainda, com somente "stains-all", olho, intestino e gônada exibiram ácido hialurônico (>100 kDa), além de heparam e/ou condroitim e dermatam importantes. Nenhuma das amostras apresentou-se isenta de proteínas.

Espectros de infravermelho, das diferentes estruturas químicas de glicosaminoglicanos, caracterizaram na anatomia branquial, o condroitim-6/4-sulfato, em pele o condroitim e o dermatam, em olho o dermatam e ácido hialurônico, em intestino o heparam predominante em relação ao dermatam, além de ácido hialurônico e, em gônada o condroitim-6/4-sulfato, heparam e ácido hialurônico. Portanto, apresentando distribuição e composição complexa e heterogênea, segundo análise de pureza e espécies químicas, entre os resíduos avaliados individualmente.

Base branquial de Tilápia do Nilo mostrou-se rica em glicosaminoglicanos antioxidantes *in vitro*, principalmente no sequestro e quelação, cujas propriedades sugeriram envolvimento de múltiplos sítios ativos, inibindo a oxidação nos ensaios utilizados, em especial, tão potentes quanto ao agente sintético BHT. Assim, este resíduo é uma fonte útil para obtenção de antioxidantes naturais, podendo ser ferramenta importante na proteção contra os danos causados por radicais livres nos organismos vivos.

REFERÊNCIAS

- ABDELMALEK, B.E.; SILA, A.; KRICHEN, F.; KAROUD, W.; MARTINEZ ALVAREZ, O.; ELLOUZ CHAABOUNI, S.; AYADI, M. A.; BOUGATEF, A. Sulfated polysaccharides from *Loligo vulgaris* skin: potential biological activities and partial purification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1143 -1151, 2015.
- ALBERTINI, R. *et al.* The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation, **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 6, n. 2, p. 129-136, 2000.
- ALENCAR, P. O. C.; LIMA, G. C.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E. C.; RIBEIRO, C. V. P.E.; SOUSA, W. M.; SOMBRA, V. G.; ABREU, C. M. W. S.; ABREU, E. S.; PONTES E. O. B.; OLIVEIRA, A. C.; PAULA, R. C. M. de; FREITAS, A. L. P. A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: *in vitro* and *in vivo* activities. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 28-34, 2019.
- AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 17, p. 7915-7922, 1993.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- ANDRADE, J. P. S.; OLIVEIRA, C. P.; TOVAR, A. M. F.; MOURÃO, P. A. S.; VILANOVA, E. A color-code for glycosaminoglycans identification by means of polyacrylamide gel electrophoresis stained with the cationic carbocyanine dye Stains-all. **Electrophoresis**, Epub, v. 29, p. 1-4, 2017.
- ARIMA, K.; FUJITA, H.; TOITA, R.; IMAZU-OKADA, A.; TSUTSUMISHITA-NAKAI, N.; TAKEDA, N.; NAKAO, Y.; WANG, H.; KAWANO, M.; MATSUSHITA, K.; TANAKA, H.; MORIMOTO, S.; NAKAMURA, A.; KITAGAKI, M.; HIEDA, Y.; HATTO, R.; WATANABE, A.; YUMURA, T.; OKUHARA, T.; HAYASHI, H.; SHIMIZU, K.; NAKAYAMA, K.; MASUDA S.; ISHIHARA, Y.; YOSHIOKA, S.; SHIRADE, S.; TAMURA, J. I. Amounts and composition al analysis of glycosaminoglycans in the tissue of fish. **Carbohydrate Research**, v. 366, n.1, p. 25-32, 2013.
- BABIKER, M. M.; IBRAHIM, H. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilótica* (L): gonadal maturation and fecundity. **J. Fish Biol.**, Oxford – England, v.14, p. 437-448, 1979.
- BADRI, A.; WILLIAMS, A.; LINHARDT, R. J.; KOFFAS, M. A. G. The road to animal-free glycosaminoglycan production: current efforts and bottlenecks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 53, p. 85-92, 2018.
- BAI, M.; HAN, W.; ZHAO, X.; WANG, Q.; GAO, Y.; DENG, S. Glycosaminoglycans from a sea snake (*Lapemis curtus*): extraction, structural characterization and antioxidant activity. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, p. 1-14, 2018.

- BANDEIRA, M. G. A.; NASCIMENTO, J. S. Estudo prospectivo relativo à atividade da tilápia para a indústria de alimentos no período de 2006 a 2016. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 10, n. 3, p. 552-562, 2017.
- BEMVENUTI, M. A.; FISCHER, L. G. **Cadernos de Ecologia Aquática**, v. 5, n. 2, p. 31-54, ago-dez, 2010.
- BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A., **Industrialização de tilápias**. GFM Gráfica & Editora, Toledo, 2007.
- BOSCOLO, W. R. *et al.* Composição química e digestibilidade aparente da energia e nutrientes da farinha de resíduo da indústria de filetagem de tilápias, para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2579-2586, 2008.
- CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Camarão Marinho: Alimento Funcional de Ótima Qualidade e Excepcional Fonte de Produtos Biotecnológicos e Biomédicos. **Revista da ABCC**, n.3, jun, 2021.
- CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão sexual em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, induzida por 17- α -metiltestosterona: proporção de sexo e histologia das gônadas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, p. 249-262, 1996.
- CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1067-1072, 2008.
- CHEW, Y. L.; GOH, J. K.; LIM, Y. Y. Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. **Food Chemistry**, v. 116, p. 13-18, 2009.
- COELHO, T. C. Síntese e caracterização de heparina de baixa massa molar. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Departamento de Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- CONTE, M. A. *et al.* A high quality assembly of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome reveals the structure of two sex determination regions. **Journal BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 341, 2017.
- COSTA, G. M. *et al.* Anatomia do tubo digestório de *Leporinus fasciatus* (Block, 1794), (Teleosteo, Anostomidae). **Enciclopédia Biosfera**, v.1, n.22, p. 2820, 2015.
- DANTAS, A. *In*: SILVA, R. O. **Descrição das diferenças anatômicas, externas e internas, observadas entre machos e fêmeas da tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2018. 19 f. Relatório Técnico-Científico. IFRN. Macau-RN, 2018.
- DHAHRI M.; MANSOUR, M.B.; BERTHOLON, I.; OLLIVIER, V.; BOUGHATTAS, N. A.; HASSINE, M.; JANDROT-PERRUS, M.; CHAUBET, F.; MAAROUFI, R.M. Anticoagulant activity of a dermatan sulfate from the skin of the shark *Scyliorhinus canicula*. **Blood Coagul Fibrinolysis**. v. 21, n. 6, p. 547-557, 2010.

DHAHRI, M.; SIOUD, S.; DRIDI, R.; HASSINE, M.; BOUGHATTAS, N. A.; ALMULHIM, F.; TALLA, Z. Al.; JAREMKO, M.; EMWAS, A. H. M. Extraction, characterization, and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from *Bursatella leachii* viscera. **Acs Omega**, v. 5, p. 14786-14795, 2020.

DELLIAS, J. M. M.; ONOFRE, G. R.; WERNECK, C. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A. N.; MELO, F. R.; FARIAS, W. R. L. Structural composition and differential anticoagulant activities of dermatansulfates from the skin of four species of rays, *Dasyatis americana*, *Dasyatis guttata*, *Aetobattus narinari* and *Potamotrygon motoro*. **Biochimie**, v. 86, n. 9-10, p. 677-683, 2004.

DIAS, M. T. A introdução da tilápia em ambientes diversos de sua origem e as consequências negativas. **Nota Técnica 003 - EMBRAPA**. Macapá - AP, 2019.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DOUGLAS, R. H.; DJAMGOZ, M. **The Visual System of Fish**. Chapman e Hall, 526 pp. 1990.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture: opportunities and challenges**. Roma, 2014a.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014b). **Fishery and aquaculture statistics**. Roma, 2014b.

FAO - **Aquaculture Newsletter**. Roma, n. 61, p.63, 2020.

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

FARNDAL, R. W.; SAYERS, C. A.; BARRETT, A. J. A direct spectrophotometric microassay for sulphated glycosaminoglycans in cartilage cal tures. **Connect Tissue Res**; v. 9, p. 247-8. 1982.

FARNDAL, R. W., BUTTLE, D. J., and BARRETT, A. J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 883, p. 173-17, 1986.

FERGUSON, H. W. Systemic Pathology of Fish, a text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Ames, **Iowa State University Press**. 1989.

FITZSIMMONS, K.; MARTINEZ-GARCIA, R.; GONZALES-ALANIS, P. Why tilapia is becoming the most important food fish on the planet. In **Proceedings of the ninth International Symposium in Tilápia in Aquaculture**, Shanghai, China, 2011.

FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; LUZIO, A.; GARCIA-SANTOS, S.; CARROLA, J.; MONTEIRO, S. Gill histopathological alterations in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water. **Brazilian Archives of Biology e Technology**, v. 51, p. 1057-1063, 2008.

FRACALOSSO, D. M.; CYRINO, J. E. P. Nutriaqua: **Nutrição e Alimentação de Espécies de Interesse para Aquicultura Brasileira**. Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012.

FRASER, J. *et al.* Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal International Medical**, Baltimore, v. 242, n. 1, p. 27-33, 1997.

FRITSCHES, K. A. *et al.*, **Current Biology**, v. 15, p. 55 - 58, 2005.

FUGI, R.; HAHN, N. S. Espectro alimentar e as relações morfológicas com o aparelho digestivo de três espécies de peixes comedores de fundo do rio Paraná, Brasil. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 51, n. 4, p. 873-879, 1991.

FÚRIA, R. R. **Efeito da fração solúvel em água do mar do petróleo e do diesel sobre a morfologia das brânquias de *Trachinotus* sp. (Perciformes: Carangidae)** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2005.

FURUYA, W. M. (Ed.). **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápia**. Toledo: GFM, 98 p. 2011.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. Atlas of fish histology. **Science Publishers**, Enfield, NH, USA. 2009.

GONÇALVES, E. L. T.; JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M. L. On the importance of monogenean helminthes in Brazilian cultured Nile tilapia. **Neotropical Helminthology**, v. 3, p. 53-56, 2009.

GONÇALVES, A. A. (Org.). **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação e legislação**. São Paulo, Editora Atheneu, 2011.

HOINACKI, E.; MOREIRA, M. V.; KIEFER, C. G. **Manual básico de processamento de couro**. SENAI/RS. Estância Velha: Centro Tecnológico de Couro, 1989.

IGARASHI, M. A. Aspectos tecnológicos e perspectivas de desenvolvimento do cultivo de tilápia no Brasil. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 21, n. 3, p. 123-130, jul/set, 2018.

JRIDI, M.; NASRI, R.; MARZOUG, Z.; ABDELHEDI, O.; HAMDI, M.; NASRI, M. Characterization and assessment of antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides extracted from cuttlefish skin and muscle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1221-1228, 2019.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JOAZEIRO, P. P.; MONTES, G. S. *et al.* The collagen fiber architecture of brasilian naked skin. **Brazilian Journal Medicinal Biological Research**, v.16, p. 313-316, 1983.

KADAM, S. U.; PRABHASANKAR, P. Marine foods as functional ingredients in bakery and pasta products. **Food Research International**, Toronto, v. 43, p. 1975-1980, 2010.

KUBITZA, F. Aproveitamento dos subprodutos do processamento de pescados. **Panorama da Aqüicultura**, v. 16, p. 23-29, 2006.

LACERDA, S. M. S. N. **Transplante de espermatogônias: a tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental**. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). UFMG, Belo Horizonte - MG, 2006.

LAGLER, K. F.; BARDACH, J. E.; MILLER, R. R. e PASSINO, D. R. **Ichthyology**. John Wiley & Sons, New York, 506p, 1977.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male productive system fish. In: KROBIL, E.; NEILL, J. D. (ed). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, v. 3, p. 20-30, 1999.

LEONARDO, J. M. L. O., *et al.* Histologia das brânquias de larva da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 863-870, 2001.

LI, J.; VLODAVSKY, I. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 823-828, 2009.

LICHTENFELS, A. J. E. C. *et al.* Effects of water pollution on the gill apparatus of fish. **J Comp Path**, v. 115, p. 47-60, 1996.

LIMA-JUNIOR, E. M.; PICOLLO, N. S.; MIRANDA, M. J. B.; RIBEIRO, W. L. C.; ALVES, A. P. N. N.; FERREIRA, G. E.; PARENTE, E. A.; MORAES-FILHO, M. O. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, v. 16, n. 1, p. 10-17, 2017.

LUPI, C.; NHACARINI, N. I.; MAZON, A. F.; SÁ, O. R. Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de *Oreochromis niloticus* (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP. **Revista Fafibe on line**, Bebedouro, n. 3, ago., 2007.

MANSOUR, M. B.; MAJDOUB, H.; BATAILLE, I.; ROUDESLE, M. S.; HASSINE, M.; AJZEN-BERG, N.; CHAUBET, F.; MAAROUFI, R. M. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 4, p. 671-678, 2009.

MARSHALL, JUSTIN; CARLETON, KAREN L; CRONIN, THOMAS. Visão das cores nos organismos marinhos. **Opinião atual em Neurobiologia**, v. 34, p. 86-94, out, 2015.

MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A. B.; BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1475, p. 287-294. 2000.

MELO, E. I.; PEREIRA, M. S.; CUNHA, R. S.; SÁ, M. P. L.; MOURÃO, P. A. S. Controle da qualidade das preparações de heparina disponíveis no Brasil: implicações na cirurgia

cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 2, p. 169-174, 2008.

MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 200p. 2001.

MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT, J. R. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Journal of Morphology**, v.247, p. 172-195, 2001.

MOURA, H. C.; NOVELLO, C. R.; ALFARO, A. da T.; BARDDAL, H. P. de O.; ALFARO, E. B. e DÜSMAN, E. Características e aplicações dos Glicosaminoglicanos: Uso de subprodutos da indústria de alimentos. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 3, p. 1421-1436, 2020. <https://doi.org/10.34115/basrv4n3-053>, 2020.

MOURA, H. C.; NOVELLO, C. R.; BALBINOT-ALFARO, E.; DÜSMAN, E.; BARDDAL, H. P. O.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; ALFARO, A. T. Obtaining glycosaminoglycans from tilapia (*Oreochromis niloticus*) scales and evaluation of its anticoagulant and cytotoxic activities. **Food Research International**, v. 140, 2021.

NAGAHAMA, Y.; DEVLIN, R. H. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, p. 191-364, 2002.

NAMASIVAYAM, S.; PASIYAPPAZHAM, R.; PALANIAPPAN, S.; SHANMUGAM, V.; ALAGIRI, S., ANNAIAN, S. Extraction, characterization and its antioxidant efficacy of polysaccharides from *Sepia aculeata* (Orbigny, 1848) cuttlebone. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 138-144, 2014.

NANDINI, C. D.; ITOH, N.; SUGAHARA, K. Novel 70 kDa chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains with a unique heterogeneous sulfation pattern from shark skin, which exhibit neurite outgrowth activity and binding activities for growth factors and neurotrophic factors. **Journal of Biology Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4058-4069, 2005.

NASCIMENTO, R. V.; PEREIRA, V. A.; MONTEIRO, P. S. A.; SALES, Y. S.; ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; COSTA, T. O.; OLIVEIRA, A. G.; MONTENEGRO, A. R.; VANDERLEY, C. S. B. S. Use of glycosaminoglycans from *Oreochromis niloticus* skin as an antioxidant supplement for milt cryopreservation of Brazilian bocachico. **Semina: Ciênc. Agrár.** Londrina, v. 42, n. 5, p. 2959-2978, set./out. 2021.

NOGUEIRA, A. V.; ROSSI, G. R.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; TRINDADE, E. S.; CIRPIANI, T. R. Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoglycans of pharmacological interest. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 239-248, 2019.

OGAWA, M.; MAIA, E. L.; Manual de Pesca. **Ciência e Tecnologia do Pescado**. São Paulo, Varela, v. 1, 453 p. 1999.

OLIVEIRA, M. M. *et al.* Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico: análise bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1218-1223, 2006.

OLIVEIRA, G. B.; VALE, A. M.; SANTOS, A. C.; MOURA, C. E. B.; ROCHA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. F. Composition and significance of glycosaminoglycans in the uterus and placenta of mammals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 4, p. 512-520, 2015.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n. 1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, A. P. V.; FEITOSA, V. A.; OLIVEIRA, J. M.; COELHO, A. L.; VIEIRA, L. A. P.; SILVA, F. A. R.; SOBRINHO, F. A. F.; DUARTE, E. B.; SOUZA, B. W.; SOUZA FILHO, M. S. M. Characteristics of chondroitin sulfate extracted from tilapia (*Oreochromis niloticus*) processing. **Procedia Engineering**, v. 200, p. 193-199, 2017.

PALLER, V. G. V.; GUERRERO III, R. D. Histological effects of 17- α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation of *Oreochromis niloticus* L., fry. **Asia Life Sciences**, Philippines, v. 10, p. 55-68, 2001.

PEIXE BR 2020. Anuário 2020. Peixe BR da Piscicultura.
<https://www.peixebr.com.br/anuario-2020>. Acesso em 20 de julho de 2020.

PEREIRA, V. A.; ALENCAR, D. B.; ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; LOPES, J. T.; NUNES, L. T.; FERREIRA, Y. M.; LOBATO, J. S.; MONTENEGRO, A. R.; VANDERLEY, C. S. B. S. Supplementation of cryodiluent media with seaweed or Nile tilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) semen. **Aquaculture**, v. 528, p. 735553, 2020.

PEREIRA, V. A.; NASCIMENTO, R. V.; MONTEIRO, P. S. A.; ARAÚJO, M. S. O.; FERREIRA, Y. M.; TORRES, T. M.; SALES, Y. S.; ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; FEITOSA, J. P. M.; SOARES, S. A.; MONTENEGRO, A. R.; VANDERLEY, C. S. B. S. The effect of glycosaminoglycans, extracted from the skin of tilapia, in the sperm freezing medium of *Colossoma macropomum*. **Cryo Letters**, v. 42, n. 5, p. 272-282, 2021.

PFEILER, E. Acidic glycosaminoglycans in marine teleost larvae: Evidence for a relationship between composition and negative charge density in Elopomorph Leptocephali. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119B, n. 1, p. 137-144, 1998.

POMIN, V. H. Sulfated glycans in inflammation. **European Journal Medicinal Chemistry**. v. 92, p. 353-369, 2015.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, n. 269, p. 337-341, 1999.

QUEIROZ, R. B. **Estudo da viabilidade econômica da criação de tilápias em tanques escavados no oeste paranaense**. 26p, 2015. Disponível em <<http://acervodigital.ufpr.br>>. pdf. Acesso em: 18 dez. 2020.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMÍREZ, A. Salmon by-product proteins. Rome: FAO, 2007. 31 p. (Fisheries Circular, Issue 1027), 2007.

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 de tilápia do Nilo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 697-704, 2012.

REBOUÇAS, P. M. *et al.* Influência da oscilação térmica na água da piscicultura. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, Mossoró, v. 2, n. 2, p. 35-42, 2014.

REGNAULT, M; DURAND, F. Glycosaminoglycans in gills of an intertidal crab (*Carcinus maenas*): Changes in the gag population in response to prolonged air exposure. **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, p. 554-564, 1998.

RODRIGUES, J. A. G.; BEZERRA-NETO, J. T. B.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. Análise de metodologias na precipitação de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (FORSSKAL) J. AGARDH. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v. 4, n. 1, p. 32-43, 2009.

RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; PAULA, G. A.; LIMA, T. B.; BESSA, E. F.; BENEVIDES, N. M. B. Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2011a.

RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; QUEIROZ, I. N. L.; COURA, C. O.; ARAÚJO, G. S.; BENEVIDES, N. M. B. Purificação, caracterização físico-química e atividade anticoagulante de glicosaminoglicanos isolados da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 233-241, 2011b.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; BENEVIDES, N. M. B. Glicosaminoglicanos isolados da pele de palombeta (*Chloroscombrus chrysurus*) e guaiúba (*Ocyurus chrysurus*): características e implicações biológicas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 34, n. 2, p. 141-148, 2012.

RODRIGUES, J. A. G.; SALLES, T. C.; AMARAL, G. F.; ARAÚJO, I. W. F.; MOURÃO, P. A. S. Depolimerização enzimática e análise sobre a coagulação de glicosaminoglicano bruto da pele de tilápia, *Oreochromis niloticus*. **Revista Higiene Alimentar**, v. 31, p. 481-485, 2017.

RODRIGUES, L. P.; QUEROL, E.; BRACCINI, M. D. C. Descrição morfo-histológica do ovário de *Acestrorhynchus pantaneiro* (Menezes, 1992) (Teleostei, Characidae), em seus diferentes estádios de desenvolvimento, na bacia do rio Uruguai médio, Uruguaiana-RS. **Biodivers Pampeana**, v.3, p.11-18, 2005.

- ROSA, C. S.; HOELZEL, S. C.; VIERA, V. B.; BARRETO, P. M.; BEIRÃO, L. H. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.9, dez, 2008.
- ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. **Embrapa Pantanal**, Corumbá, 48p, 2003.
- ROY, P.; KULKARNI, A. P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 563-570, 1996.
- RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SHINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Histological and histopatological of the testis. *Bolestra*. **Cache River Press**, v. 1, p. 4-20, 1990.
- SALLES, T. C.; RODRIGUES, J. A. G.; BARCELLOS, P. G.; AMARAL, G. F.; ARAÚJO, I. W. F.; MOURÃO, P. A. S. Inhibition of thrombin generation by dermatan sulfate isolated from the skin of *Oreochromis niloticus*. **Agrária, Recife**, v. 12, n. 1, p. 98-104, 2017.
- SAMPAIO, L. O.; TERSARIOL, I. L. S.; LOPES, C. C.; BOUÇAS, R. I.; NASCIMENTO, F. D.; ROCHA, H. A.; NADER, H. B. Heparins and heparan sulfates. Structure, distribution and protein interaction. In: Verli H. Insights Into Carbohydrate Structure and Biological Function. **Transworld Research Network**, Kerala, p. 1-24, 2006.
- SANTOS, V. B. **Histologia de Peixes**. São Paulo. Ed. FUNEP. 80p, 1991.
- SANTOS, S. G. *et al.* Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq Bras Méd Vet Zootec.**, v. 59, n. 2, p. 376-381, 2007.
- SCHULTER, E. P., VIEIRA FILHO, J. E. R. Evolução da Piscicultura no Brasil: Diagnóstico e Desenvolvimento da Cadeia Produtiva de Tilápia. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA**. Rio de Janeiro, 2017.
- SEIXAS FILHO, J. T.; BRÁS, J. M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Anatomia Funcional e Morfometria dos Intestinos e dos Cecos Pilóricos do Teleostei (Pisces) de Água Doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). **Rev. Bras. Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 313-324, 2000.
- SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.
- SILVA, G. D. F.; MACIEL, L. M.; DALMAS, M. V.; GONÇALVES, M. T. Tilápia do Nilo. **A criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná**, Curitiba-PR, p. 44-292, 2015.
- SILVA, J. V. G. **Caracterização estrutural de dermatam sulfato de córnea bovina e pele suína e cinética enzimática de condroitinases AC de *Flavobacterium heparinum* e *Pedobacter heparinus***. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Farmácia - UFJF. Juiz de Fora - MG, 2018.
- ŠLIŽYTĖ, R.; RUSTAD, T.; STORRØ, T. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products optimization of yield and properties of lipid and protein fraction. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 3680-3692, 2005.

SMITH, B. J. *et al.* Gross morphology and topography of the adult intestinal tract of the tilapian fish, *Oreochromis niloticus* L. **Cells Tissues Organs**, v. 166, n. 3, p. 294-303, 2000.

SOUZA, M. L. R. Tecnologia para processamento das peles de peixe. EdUEM, **Coleção Fundamentum**. Maringá, 2004.

SOUZA, M. L. R. O que fazer com as peles de peixes? **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro-RJ, 2004.

SOUZA, M. B. W. S.; DELLIAS, J. M. M.; MELO, F. R.; SILVA, L. C. F. Structural 264 composition and anticoagulant activity of dermatan sulfate from the skin of the electric eel, 265 *Electrophorus electricus* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v. 147, 266, n. 3, p. 387-394, 2007.

SOUZA, R. S.; PINHAL, M. A. S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 48-54, jan./abr., 2011.

SOUZA, R. B.; FROTA, A. F.; SOUSA, R. S.; CEZARIO, N. SANTOS, T. SOUZA, L. M. COURA, C. O.; MONTEIRO, V. S.; CRISTINO FILHO, G.; VASCONCELOS, S.M.; CUNHA, R. M.; AGUIAR, L. M.; BENEVIDES, N. M Neuroprotective effects of sulphated agar from marine alga *Gracilaria cornea* in rat 6 Hydroxydopamine Parkinson's disease model: Behavioural, neurochemical and transcriptional alterations. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 120, n. 2, p. 159-170, 2016.

SOUZA, M. L. R.; VIEGAS, E. M. M.; NAKAGHI, L. S. O.; DOURADO, D. M.; KRONKA, S. N.; GOES, E. S. R. Morfologia, composição centesimal e alterações ocorridas no processo de curtimento da pele da tilápia do Nilo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, 2021.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v. 46, p. S14-S18, Supplement 2, 1997.

STROBAND, H. W. J.; van der VEEN, F. H. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of grasscarp *Ctenopharyngodon idella*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 218, p. 149-156, 1981.

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

TAYLOR, K. B.; JEIFREE, G. M. A new basic metachromatic dye, 1,9 dimethylmethylene blue. **Histochem J.**, v. 1, p. 199-204. 1969.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TORRES, R. G. A.; GONZÁLEZ, P. S.; PEÑA, S. E. Anatomical, Histological and Ultrastructural Description of the Gills and Liver of the Tilapia (*Oreochromis niloticus*).

International. **Journal of Morphology**, v. 28, p. 703-712 (in Spanish, with abstract in English), 2010.

TSENG, Y. C.; HWANG, P. P. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. **Comparative Biochemistry e Physiology**, v. 148, p. 419-429, 2008.

TURNER, SALLY M. Oftalmologia em Pequenos Animais. Série Clínica - Veterinária na Prática – Editor da Série: Fred Nind. **Elsevier**, 2010.

TURRA, E. M.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEIXEIRA, E. A.; LUZ, R. K.; PRADO, S. A.; MELO, D. C.; FARIA, P. M. C.; SOUSA, A. B. Controle reprodutivo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de manipulações sexuais e cromossômicas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 1, p. 21-28, jan./mar. Belo Horizonte, 2010.

VALCARCEL, J.; NOVOA-CARBALLAL, R.; PÉREZ-MARTÍN, R. I.; REIS, R.L.; VÁZQUEZ, J. A. Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agentes. **Biotechnology Advances** v. 35, p. 711-725, 2017.

VICENTE, I. S. T.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES, C. E. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392-398, 2014.

VIDAL, J. M. A.; RODRIGUES, M. C. P.; ZAPATA, J. F. F.; VIEIRA, J. M. M. Concentrado proteico de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciências Agrônômica**, v. 42, p. 92-99, 2011.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G. S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de Tilápia e sua utilização na alimentação animal. São Paulo: Pesca, 2006. Disponível em: <<http://www.pesca.sp.gov.br>>. Acesso em: 11 jan. 2021.

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, n. 24, p. 4060-4066, 2002.

WASERMAN, L.; BER, A.; ALLALOUF, D. Acidic glycosaminoglycan composition of the gills of *Cyprinus carpio*. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 42B, p. 669-677, 1972.

WIGGERS, V. R. *et al.* Biofuels from waste pyrolysis: continuous production in a pilot plant. **Fuel**, Guildford, v. 88, n. 11, p. 2135-2141, 2009.

WILSON, J. M.; CASTRO, L. F. C. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. **Fish Physiology. The Multifunctional Gut of Fish**, v. 30, p. 1-55, 2010.

WISNIEWSKI JUNIOR, A. *et al.* Biofuels from waste pyrolysis: chemical composition. **Fuel**, Guildford, v. 89, n. 3, p. 563-568, 2010.

WITZUM, J. L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis. **Lancet**, London, v. 344, n. 8926, p. 793-795, 1994.

WU, M.; XU, S.; DING, H. Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitinsulphate from sea cucumber *Thelenata ananás*. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 716-723, 2010.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**, v. 111, p. 428-432, 2011.

YU, T. W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.