



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

ANTONIO CARLOS NUNES DE LIMA

**GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS DA BRÂNQUIA DE TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus* LINNAEUS 1758)**

FORTALEZA

2023

ANTONIO CARLOS NUNES DE LIMA

GLICOSAMINOGLICANOS SULFATADOS DA BRÂNQUIA DE TILÁPIA DO
NILO (*Oreochromis niloticus* LINNAEUS 1758)

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

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L696g Lima, Antônio Carlos Nunes de.
Glicosaminoglicanos sulfatados da brânquia de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1758) / Antônio Carlos Nunes de Lima. – 2023.
47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2023.

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

1. Peixe dulcícola. 2. Resíduo. 3. Polissacarídeos sulfatados. I. Título.

CDD 639.2

ANTONIO CARLOS NUNES DE LIMA

GLICOSAMINOGLICANOS DA BRÂNQUIA DE TILÁPIA DO NILO
(*Oreochromis niloticus* LINNAEUS 1758)

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 Ariévilo Gurgel Rodrigues
Engenheiro de Pesca
Membro externo (Orientador Técnico)

Profa. Dra. Daniele Ferreira Marques
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família, em especial aos meus pais, Antonio Nunes de Lima e Maria da Conceição Lima.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter me consagrado e por obra de sua infinita providência sempre me conduzir ao longo deste percurso.

Aos meus pais, Antonio Nunes de Lima e Maria da Conceição Lima pelo esforço na criação, por sempre me apontarem o caminho correto a ser trilhado e aos meus irmãos, Deuzival Nunes de Oliveira, Deusineilo Nunes de Lima, Deuzirane Nunes de Oliveira Silva, Deuzineide Nunes de Lima Costa, Deusivania Nunes de Oliveira e Deuzinere Nunes de Oliveira por serem exemplos e suportes nos diversos âmbitos da vida.

A minha orientadora, Professora Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo, pelo conhecimento que pode transferir, pela oportunidade de trabalhar juntos, pela paciência e confiança depositada em mim, por não me deixar desistir, sou imensamente grato.

Ao orientador técnico, Dr. José Ariévilo Gurgel Rodrigues, por toda colaboração, acompanhamento e suporte no desenvolvimento do trabalho desde os primeiros passos no Laboratório e todo conhecimento passado, as palavras serão insuficientes para expressar minha gratidão. Sem sua ajuda eu não conseguiria.

A Professora Dra. Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante, por sempre quebrar a barreira entre professor e o aluno, pela confiança passada, por ter-me trago ao BIOMAR, pela amizade. Muito Obrigado!

A Francisca Geny Marfim Fernandes, pela parceria no período em que estivemos trabalhando juntos no BIOMAR, também por ser uma das referências para que eu pudesse desenvolver essa pesquisa.

Aos amigos Gustavo Soares Figueiredo, Diego Custódio por me ajudarem no dia a dia a permanecer em meio às dificuldades em busca do meu objetivo na universidade.

A Dra. Sandra de Aguiar Soares e Johnny Peter Macedo Feitosa, membros do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais e Compósitos/Dep. Química Orgânica e Inorgânica/UFC pela realização dos espectros de infravermelho desta pesquisa.

A minha namorada, Marileuda de Oliveira Silva, por ser um suporte nos diversos momentos desta caminhada. Sempre estaremos juntos, rumo ao céu.

Ao professor Doutor Oscar Pacheco Neto por ceder os peixes utilizados nessa pesquisa, também pelo conhecimento que pude receber através de suas aulas.

Agradecimento ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC/UFC, pelo apoio financeiro, que tornou possível que esses primeiros passos no âmbito científico fossem realizados.

Não dá
Mais pra negar
O mar é Deus e o barco sou eu
O vento forte
Que me leva pra frente
É o amor de Deus
(Monsenhor Jonas Abib)

RESUMO

A filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) gera resíduos orgânicos para obtenção de polímeros de valor biotecnológico, tais como glicosaminoglicanos (GAGs), os quais aqueles de brânquia apresentam natureza complexa e heterogênea. O objetivo deste estudo foi extrair da brânquia de tilápia GAGs e analisar o emprego alternativo do álcool ou cetona, na separação de frações, sobre o rendimento e as características físico-químicas e estruturais. A brânquia desidratada (10 g) foi digerida (24 h; 60 °C) com papaína a 15% em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo cisteína e EDTA, ambos a 5 mM, e ao material filtrado, adicionado cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10% para precipitação dos GAGs. Após 24 h, o precipitado obtido foi lavado com CCP a 0,05%, dissolvido em solução de NaCl:álcool (v:v) e adicionado álcool para precipitação (4 °C;24 h). Em seguida, os GAGs brutos foram lavados duas vezes com álcool a 80%, outra com grau comercial e finalmente secos em estufa. Para fracionamento, amostra (5 mg/mL) foi preparada em água e volumes crescentes de álcool ou cetona (1-3:1) foram aplicados para precipitação dos GAGs (4 °C;72 h). As frações alcólicas (Fa1-3) ou cetônicas (Fc1-3) foram analisadas quanto ao rendimento e metacromasia por eletroforese em gel de agarose comparando-se ao condroitim sulfato (CS), dermatan sulfato e heparina padrões. Espectroscopia de infravermelho (extrato e frações), para caracterização estrutural, foi realizada em pastilhas de KBr. A brânquia desidratada rendeu $9,1 \pm 0,03\%$ em GAGs brutos ($9,1 \pm 0,26$ mg de GAGs/g de resíduo). Separação por solvente resultou apenas em Fc1 e Fa1, cujos rendimentos foram $16 \pm 0,00\%$ e $10 \pm 0,66\%$ ($p < 0,05$), respectivamente, porém não revelando, por eletroforese, metacromasia como GAG bruto tipo CS. Por outro lado, análises por infravermelho revelaram espectros com estruturas diferentes entre os materiais, especialmente pela ausência de sulfatação na Fa1, enquanto Fc1 revelou C-6-S comparada aos GAGs brutos (C-4/6-S). Assim, o uso de uma metodologia simples e de menor custo, que utiliza a cetona como agente orgânico, sugere seletiva para recuperar baixas quantidades do C-6-S da brânquia de tilápia do Nilo.

Palavras-Chaves: peixe dulcícola; resíduo; polissacarídeos sulfatados.

ABSTRACT

Nile tilapia filleting (*Oreochromis niloticus*) generates organic residues to obtain polymers of biotechnological value, such as glycosaminoglycans (GAGs), which those of the gills have a complex and heterogeneous nature. The objective of this study was to extract GAGs from tilapia gills and to analyze the alternative use of alcohol or ketone, in the separation of fractions, on the yield and physical-chemical and structural characteristics. The dehydrated gills (10 g) were digested (24 h; 60 °C) with 15% papain in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing cysteine and EDTA, both at 5 mM, and to the filtered material, cetylpyridinium chloride (CPC) at 10% for precipitation of GAGs. After 24 h, the obtained precipitate was washed with 0.05% CPC, dissolved in a NaCl:alcohol solution (v:v) and alcohol was added for precipitation (4 °C; 24 h). Then, the crude GAGs were washed twice with 80% alcohol, once with commercial grade and finally dried in an oven. For fractionation, a sample (5 mg/mL) was prepared in water and increasing volumes of alcohol or ketone (1-3:1) were applied to precipitate the GAGs (4 °C; 72 h). The alcoholic (Fa1-3) or ketone (Fc1-3) fractions were analyzed for yield and metachromasia by agarose gel electrophoresis comparing to chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate and heparin standards. Infrared spectroscopy (extract and fractions), for structural characterization, was performed on KBr pellets. Dried gills yielded $9.1 \pm 0.03\%$ crude GAGs (9.1 ± 0.26 mg GAGs/g residue). Solvent separation resulted only in Fc1 and Fa1, whose yields were $16 \pm 0.00\%$ and $10 \pm 0.66\%$ ($p < 0.05$), respectively, but did not reveal, by electrophoresis, metachromasia as crude CS-type GAG. On the other hand, infrared analyzes revealed spectra with different structures between the materials, especially due to the absence of sulfation in Fa1, while Fc1 revealed C-6-S compared to crude GAGs (C-4/6-S). Thus, the use of a simple and less costly methodology, which uses ketone as an organic agent, suggests selective recovery of low amounts of C-6-S from the gills of Nile tilapia.

Keywords: freshwater fish; residue; sulfated polysaccharide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tilápia do Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758).....	18
Figura 2 – Filamentos branquiais, lamela branquial e rastros branquiais (A e B); Coração, filamentos e lamelas branquiais (C).....	21
Figura 3 – Estrutura química dos principais glicosaminoglicanos.....	23
Figura 4 – Brânquias desidratadas de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	27
Figura 5 – Fluxograma de extração de GAGs brutos da brânquia de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	28
Figura 6 – Fluxograma de fracionamento dos GAGs brutos por precipitação com solventes.....	29
Figura 7 – Tese de metacromasia do GAG bruto e das frações (Fa1 e Fc1) na presença do azul 1,9-dimetilmetileno. C: Controle; EB: Extrato Bruto; Fa1: Fração Alcoólica; Fc1: Fração Cetônica.....	35
Figura 8 – Eletroferese em gel de agarose (0,5%) de GAGs obtidos da brânquia de <i>O. niloticus</i> . Padrões-PA (condroitim sulfato-CS, dermatan sulfato-DS e heparina-HEP), extrato bruto-EB e frações-Fa1 e Fc1 no gel tratado com azul de toluidina a 0,1%.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Rendimentos de GAGs obtidos por precipitação com álcool (Fa1) ou cetona (Fc1). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ao nível 5% (*t* de Student, $p < 0,005$)..... 33
- Gráfico 2 – Espectros de infravermelho de GAGs brutos (EB) e frações (Fa1 e Fc1) usando pastilhas de KBr..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de rendimentos em GAGs brutos de brânquias de diferentes organismos aquáticos.....	31
Tabela 2 – Comparação de rendimentos dos fracionamentos obtidos a partir dos GAGs brutos por precipitação alcoólica ou cetônica.....	33
Tabela 3 – Sinais de IV para GAGs brutos (EB), Fração alcoólica (Fa1) e Fração cetônica (Fc1), extraídos de brânquias de tilápia do Nilo.....	38
Tabela 4 – Sinais espectrais característicos de GAGs CS.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
°C	Graus Célcus
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CCP	Cloreto cetilpiridínio
CEBIAQUA	Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura
CS	Condroitim sulfato
C-4-S	Condroitim-4-sulfato
C-6-S	Condroitim-6-sulfato
Cu ²⁺	Íon cúprico
DS	Dermatan sulfato
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra as Secas
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
Fa1	Fração alcoólica
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations
Fc1	Fração cetônica
Fe ²⁺	Fração cetônica
g	Gramma
GAGs	Glicosaminoglicanos
h	Hora
HEP	Heparina
HS	Heparan sulfato
Kg	Quilograma
L	Litros
M	Molar
m	Metros
m ³	Metros cúbicos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramma
min	Minuto

mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogênico
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio e do Conhecimento Tradicional Associado
UFC	Universidade Federal do Ceará
v	Volt
ZEE	Zona Econômica Exclusiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Produção mundial de pescado.....	16
1.2	Produção brasileira de pescado.....	16
1.3	A tilápia do Nilo.....	17
1.4	O processo de filetagem e geração de resíduos.....	18
1.5	Estrutura branquial de peixes teleósteos.....	20
1.6	Glicosaminoglicanos.....	21
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1	Obtenção e tratamento da matéria-prima.....	26
2.2	Extração dos GAGs.....	27
2.3	Fracionamento dos GAGs brutos por precipitação alcóolica ou cetônica.....	28
2.4	Ensaio de metacromasia.....	29
2.5	Análise físico-química de GAGs por eletroforese em gel de agarose.....	29
2.6	Análise estrutural dos GAGs por espectroscopia de infravermelho	30
2.7	Análises estatísticas.....	30
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1	Rendimento de GAGs brutos da brânquia de tilápia do Nilo.....	31
3.2	Rendimento de GAGs brutos fracionados por precipitação alcoólica ou cetônica.....	32
3.3	Análise metacromática preliminar de sulfatação.....	35
3.4	Caracterização por eletroforese em gel de agarose.....	36
3.5	Análise estrutural dos GAGs por espectroscopia de infravermelho	37
4	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produção mundial de pescado

Dados divulgados em 2022 pela FAO (*Food and Agriculture Organization of United Nations*) indicaram que a produção global de pescado atingiu cerca de 178 milhões de toneladas de pescados no ano de 2020, revelando, portanto, uma ligeira queda segundo aqueles de 2018, os quais apontaram para uma produção histórica de 179 milhões de toneladas de pescados. Este declínio pode está ligado a diversos fatores, entre eles os impactos causados pela COVID-19.

Do volume produzido em 2020, 112 milhões de toneladas (63%) foram derivados de águas marinhas, das quais 78,8 milhões de toneladas (70%) foram obtidas da pesca enquanto 33,2 milhões de toneladas (30%) da aquicultura. Já os pescados de águas interiores somaram 66 milhões de toneladas (37%), com 54,5 milhões de toneladas (83%) oriundas da aquicultura ao passo que 11,5 milhões de toneladas (17%) da pesca. Assim, a captura pela atividade pesqueira foi a responsável por cerca de 51% do pescado produzido, enquanto a aquicultura contribuiu com 88 milhões de toneladas (49%) (FAO, 2022).

De acordo ainda com a referida entidade, em 2019, o continente asiático já apresentava o maior consumo mundial de pescado, diferente do perfil encontrado na Europa e Estados Unidos que tiveram suas proporções de consumo alimentar de origens aquáticas diminuídas. O consumo global de alimentos aquáticos vem aumentando significativamente, superior a cinco vezes à quantidade consumida há quase 60 anos, correspondendo assim um crescimento da taxa média anual de 3,0% em comparação com a taxa de crescimento da população de 1,6%.

1.2 Produção brasileira de pescado

De acordo com Ximenes (2021), o Brasil tem condições de se tornar grande produtor de pescado e assim substituir importações, ingressar no mercado global e alavancar o panorama doméstico, além de uma vasta extensão de Zona Econômica Exclusiva (ZEE) e de costa marítima, com 8.500 km de extensão.

O mesmo autor ainda cita que o Brasil possui 12% da água doce disponível no planeta, além de grande volume de água subterrânea e de reservatórios, associadas a condições climáticas favoráveis; alta disponibilidade de mão de obra; características ambientais propícias à produção intensiva em mar aberto ou na região costeira (maricultura); localização estratégica para escoamento da produção para o Cone Sul, Europa e EUA, e; dentre outros. Apesar disso, há muitos desafios para a ampliação da produção aquícola e de capturas que são relevantes, mas com planejamento e políticas públicas de apoio ao setor produtivo são possíveis de superação.

Em 2022, o Brasil produziu um pouco mais de 860.355 toneladas de peixes de cultivo (tilápia, peixes nativos e outras espécies) e, quando comparado ao ano anterior (2021), alcançou um crescimento na produção de 2,3% com 841.005 toneladas (Peixe BR, 2023).

A piscicultura constitui a atividade de produção animal que mais cresceu nos últimos anos no País, e, em 2022 não foi diferente, tendo a tilápia do Nilo como principal espécie cultivada, cuja produção alcançou 550.060 toneladas, um crescimento de 3,0% em relação o ano anterior (534.005 toneladas). A espécie atingiu 63,9% da produção de peixes dulcícolas de cultivo em todo o território brasileiro (Peixe BR, 2023)

O estado do Paraná liderou a produção de peixes de cultivo na piscicultura brasileira no ano de 2022, seguido pelo estado de São Paulo, enquanto o estado do Ceará ocupou a vigésima colocação no cenário nacional, onde suas respectivas produções em toneladas foram de 194.100, 83.400 e 6.860 (Peixe BR, 2023). Esse diagnóstico na produção, por estado da federação, foi impactado pelo avanço da tecnologia de cultivo no Sul e Sudeste do País, enquanto os períodos prolongados de estiagem para aporte e segurança hídrica nos reservatórios cearenses comprometeram a produção de tilápia na última década (XIMENES, 2021).

1.3 A tilápia do Nilo

Nativa do Rio Nilo e descoberta por volta de 4000 anos atrás, a espécie africana tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi classificada por Linnaeus (1758)

(FIGURA 1) e considerada uma das espécies de água doce mais conhecida e disseminada no planeta (OLIVEIRA, 2020).

Figura 1. Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).



Fonte: Autor (2023)

A espécie *O. niloticus* é um peixe do grupo dos Teleósteos, pertence à família *Cichlidae*, que possui mais de 1900 espécies distribuídas no mundo, com já cerca de 290 já descritas. É da subfamília dos Pseudocrenilabrinae, pertencente à ordem dos Perciformes e ao gênero *Oreochromis*. Possui hábito alimentar herbívoro/onívoro com baixa seletividade alimentar e preferência por fitoplâncton e detritos de origem vegetal nos seu estágio de vida adulta (CARRETERO, 2012).

Diversos fatores contribuem para o cultivo e o mercado da espécie no país, como por exemplo, a rusticidade, o ótimo desenvolvimento em ambientes com temperaturas que variam de 25 a 30 °C, boa relação custo/benefício para os consumidores, a alta qualidade da sua carne, de sabor suave, cor branca e textura firme, resistência a doenças, tolerância ao cultivo em altas densidades e em ambientes adversos e estressantes, entre outros (SILVA *et al.*, 2015).

No Brasil, a tilápia do Nilo foi introduzida no município cearense de Pentecoste, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em 1971, com o objetivo inicial de repovoamento nos reservatórios públicos da região Nordeste e atualmente vem sendo cultivada e comercializada em todo território nacional (CARRETERO, 2012), gerando divisas e proporcionando um maior desenvolvimento do agronegócio brasileiro (IGARASHI, 2003).

1.4 O processo de filetagem e geração de resíduos

Para o maior interesse do consumidor e agregação de valor no mercado, os peixes inteiros congelados e o filé são os principais produtos da tilápia (BOSCOLO; FEIDEN, 2007). A preferência do filé de tilápia pelo mercado consumidor é justificada pela sua carne branca de textura firme, de sabor suave e ausência de espinhas em forma de “y”. Essas características levam a um maior rendimento após o beneficiamento, cujo processo de filetagem é ainda determinado segundo diversos fatores, por exemplo, linhagem, sexo, tamanho da cabeça, estrutura anatômica do corpo e porcentagem de resíduos (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

Por outro lado, o processo de filetagem de tilápias gera um volume substancial de resíduos orgânicos, como por exemplo, vísceras, espinhas, olhos, brânquias, intestino etc, geralmente descartados de maneira inadequada causando impactos ambientais, sociais e econômicos. Uma das formas de aproveitamento desses resíduos de peixes é seu uso para obtenção de biomoléculas de potencial biotecnológico (ALCÂNTARA *et al.*, 2023; NOGUEIRA *et al.*, 2019)

As carcaças e cabeças podem ser utilizadas para produção de caldos e sopas (GODOY, 2010). As cabeças também podem ser usadas para produção de gelatinas, assim como, a pele, mediante a extração do colágeno (SILVA *et al.*, 2011; YAJIMA; FRANCO; BORDIGNON, 2011), enquanto as carcaças podem ser usadas para isolar carne mecanicamente separada para elaboração de coprodutos de valor agregado (ROSA, 2009). Há vários métodos para aproveitamento de subprodutos que já são conhecidos, porém, os mais representativos são a farinha de peixe e obtenção de óleo, ambos destinados para produção de ração animal (BOSCOLO *et al.*, 2010).

Os resíduos gerados no processamento do pescado são de alta qualidade nutricional e podem ser consideradas fontes de proteínas, enzimas e lipídeos não aproveitados, possibilitando o encaminhamento para outros fins como produção de suplementos proteicos (KADAM; PRABHASANKAR, 2010). Aproximadamente 50% da massa de peixes é resíduo (cabeça, nadadeiras, pele e vísceras) e cerca de 15% dos peixes são vísceras. Este material residual é geralmente descartado por falta de destino adequado. Esta grande quantidade de resíduo pode ser usada como matéria-prima para extração de compostos de interesse farmacológico, como os glicosaminoglicanos (NOGUEIRA *et al.*, 2019).

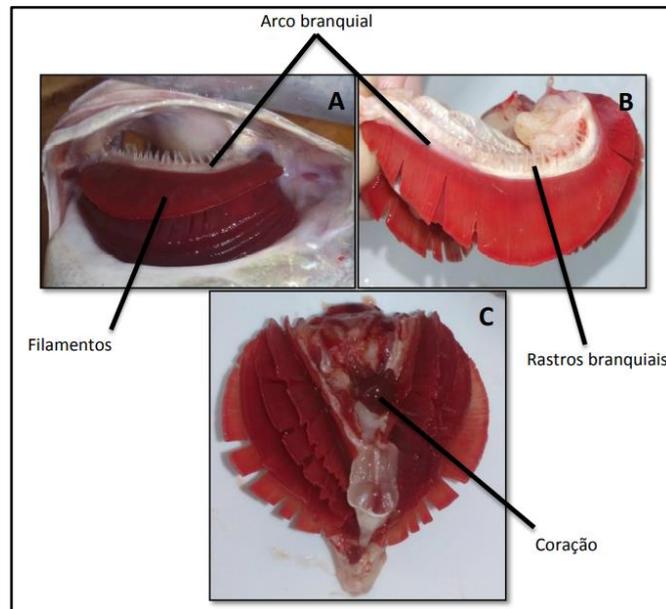
1.5 Estrutura branquial de peixes teleósteos

A brânquia é um órgão onde ocorrem as trocas gasosas e os processos osmorregulatórios, equilíbrio ácido básico, excreção de compostos nitrogenados, o que faz que ela tenha uma enorme importância para a saúde do peixe. Além disso, sua complexidade e contato constantes com o ambiente externo fazem da brânquia alvo de poluentes de origem hídrica (FONTAÍNHAS-FERNANDES *et al.*, 2008).

As tilápias, como a maioria dos teleósteos, realizam respiração branquial e possuem brânquias compostas por quatro arcos branquiais que possuem duas fileiras de filamentos branquiais (FIGURA 2), os quais dispõem de inúmeras lamelas branquiais, onde ocorre a troca gasosa. O interior das lamelas é composto por pequenos canais que liberam a passagem de uma célula sanguínea por vez, o que ocasiona uma troca gasosa. A tilápia do Nilo possui quatro pares de brânquias e cada uma é formada por um arco branquial, onde os filamentos branquiais estão inseridos. As fendas branquiais são por onde a água passa e ficam localizadas entre as brânquias. Posterior às brânquias está o coração que possui duas cavidades denominadas átrio e ventrículo. Do coração o sangue é bombeado e segue para as brânquias, pelos vasos branquiais aferentes onde ocorre a troca gasosa e, por fim, sai através das alças coletoras eferentes, num processo de contracorrente com a água vindo do meio externo e indo para a aorta dorsal (SILVA *et al.*, 2015).

Na brânquia da carpa comum *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758), por exemplo, foi encontrado Glicosaminoglicanos (GAGs) com efeitos anticoagulantes, como condroitim sulfato em diferentes níveis, contendo glucosaminas pertencentes aos grupos sulfato de heparan ou heparina (WASSERMAN; BER; ALLALOUF, 1972). Fernandes (2022) identificou que o condroitim sulfato está presente como GAG único na brânquia, porém não distribuído em quantidades homogêneas entre as diferentes estruturas anatômicas da brânquia.

Figura 2. Filamentos branquiais, lamela branquial e rastros branquiais (A e B); Coração, filamentos e lamelas branquiais (C).



Fonte: SILVA *et al.* (2015)

1.6 Glicosaminoglicanos

Glicosaminoglicanos (GAGs) compõem uma família de polissacarídeos sulfatados lineares de natureza complexa e heterogênea, encontrados no reino animal (MEDEIROS *et al.*, 2000; VOLPI; MACCARI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Eles possuem aminoaçúcares (glucosamina e galactosamina) e grupos carboxilados (ácido urônico) (BADRI *et al.*, 2018; FERNANDES, 2022), variando quanto à quantidade, tipo de ligação glicosídica e ao grau e posição de sulfatação. São polímeros formados por resíduos repetitivos de dissacarídeos de ácido urônico (geralmente o ácido D-glicurônico ou o ácido L-idurônico) e de N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina. Em alguns GAGs uma ou mais das hidroxilas do açúcar aminado estão esterificadas com sulfatos (MOTTA, 2005).

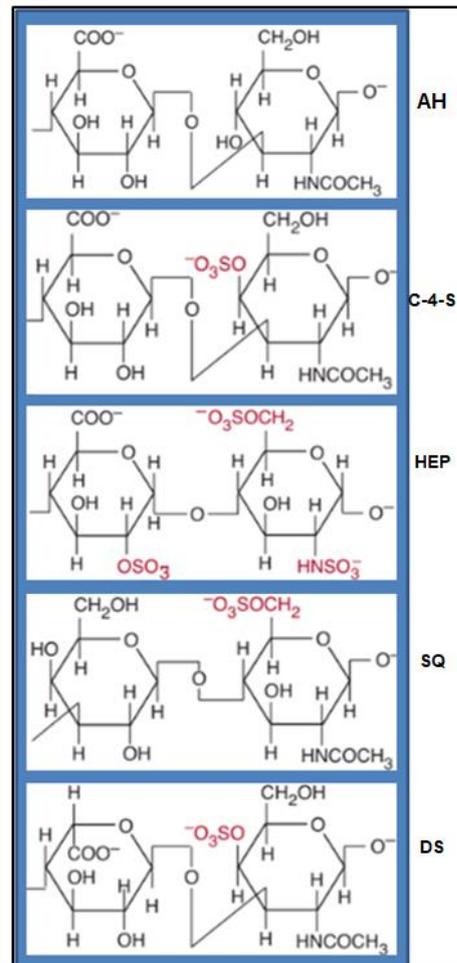
Os GAGs são encontrados nas matrizes extracelulares em diferentes sistemas de filamentos do reino animal que apresentam organização tissular (DIETRICH *et al.*, 1976; MEDEIROS *et al.*, 2000). Os GAGs são conhecidos por estarem envolvidos em funções fundamentais para comunicação celular, diferenciação e crescimento (VALCARCEL *et al.*, 2017). Entretanto, em várias enfermidades genéticas, os mucopolissacarídeos estão envolvidos nas causadas por defeitos no metabolismo, podendo ser utilizados como biomarcadores (MOTTA, 2005).

Os GAGs participam em numerosas funções celulares e exibem princípios ativos importantes para a elaboração de medicamentos (MEDEIROS, 2000; NOGUEIRA *et al.*, 2019). Estudos de distribuição, disponibilidade e caracterização química podem contribuir sobre o conhecimento do papel fisiológico destes compostos em diferentes órgãos, bem como para uso biotecnológico (ALCÂNTARA *et al.*, 2023; JRIDI *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2017; SAMPAIO *et al.*, 2006).

Além de suas funções celulares, os GAGs ganharam importância nutracêutica, farmacêutica, biomaterial e biomédica. Já em escala industrial, o isolamento de GAGs é a partir de resíduos provenientes de abatedouros onde ocorre o processamento de animais (boi e porco) pela indústria de alimentos e ração que geram muitos descartes no processamento (GAVVA *et al.*, 2019).

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). Dentre os GAGs de maior relevância química e medicinal estão o condroitim sulfato (CS), o dermatan sulfato (DS), o heparan sulfato (HS), a heparina (HEP), o ácido hialurônico (AH) e o queratam sulfato(SQ) (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Dos quais, o AH é destituído de sulfatação e pode ocorrer livre no tecido, não formando agregados de proteoglicanos (GAVVA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2015), mas ocorrendo impurezas quando isolados (ALCÂNTARA *et al.*, 2023). Tais estruturas estão representadas na figura 3.

Figura 3. Estrutura química dos principais glicosaminoglicanos.



AH - ácido hialurônico; C- 4-S – condroitim-4-sulfato; HEP – heparina; SQ – queratam sulfato; DS – dermatan sulfato

Fonte: Adaptado de LAMOUREUX *et al.* (2007)

A tilápia do Nilo, *O. niloticus*, tem demonstrado uma plataforma útil para exploração bioquímica e fonte relevante em GAGs para aplicações biotecnológicas, de vários resíduos sólidos descartados de filetagem. Rodrigues *et al.* (2011) e Salles *et al.* (2017), isolaram da pele DS com inibição *in vitro* da formação de coágulo sanguíneo, porém menos eficaz que HEP e DS de mamífero. Já Nogueira *et al.* (2019), aplicando a enzima Alcalase na digestão de vísceras frescas, observaram por eletroforese e infravermelho à presença de CS/DS/HS expressando efeito anticoagulante *in vitro*. Potenciais *in vitro* ainda revelaram GAGs antioxidantes isolados da pele como agentes seguros para uso na suplementação de meio criodiluidor dos sêmens de tambaqui, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1818),

(PEREIRA *et al.*, 2020 e 2021) e de curimatã, *Prochilodus brevis* (Steindachner, 1875) (NASCIMENTO *et al.*, 2021).

Em estudo sobre os GAGs presentes em alguns resíduos de tilápia, Fernandes (2022) avaliou a disponibilidade, as características físico-químicas e estruturais de GAGs brutos extraídos dos resíduos brânquia – arco e base, pele, olho, intestino e gônada removidos de exemplares masculinizados de tilápia do Nilo cultivados em um sistema de recirculação de água em tanques de alvenaria. Esse peixe apresentou distribuição e bioquímica complexa de GAGs, com perfil de sulfatação preponderante na anatomia externa do que na cavidade abdominal do animal e brânquia constituída somente por CS em quantidade mais significativa que nos demais resíduos avaliados, além deste GAG, quando isolado da sua região de base, mostrando-se com potencial antioxidante *in vitro* equivalente à atividade de sequestro do agente sintético butilhidroxitolueno. Recentemente, Alcântara *et al.* (2023) descobriram que o AH, isolado do globo ocular de tilápia do Nilo, estimulou a proliferação de fibroblastos *in vitro*.

É de conhecimento que existe uma dificuldade na obtenção de polissacarídeos seguros de fontes terrestres, como a HEP, um polissacarídeo sulfatado tradicionalmente usado em desordens do sistema circulatório, porém sua produção comercial do boi e porco acarreta riscos potenciais de contaminação biológica/química/viral, necessitando de um rigoroso controle de qualidade para uso clínico (MELO *et al.*, 2008).

A recuperação de moléculas inovadoras a partir de resíduos gerados da filetagem de peixes consiste de uma tecnologia ainda em desenvolvimento, especialmente das partes não comestíveis, desde que não há o aproveitamento integral do pescado procedente das etapas da cadeia produtiva do pescado e da indústria para fins de exploração biotecnológica ou muito menos para o mercado (PINTO *et al.*, 2017).

O objetivo geral desta pesquisa foi obter GAGs brutos da estrutura branquial de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e avaliar o rendimento desta extração. Os objetivos específicos foram: Comparar os rendimentos obtidos nesta pesquisa com os rendimentos adquiridos em pesquisa envolvendo o mesmo protocolo e espécie (*O. niloticus*) para o resíduo branquial separado (arco e base); Comparar rendimentos de GAGs brutos extraídos com outras metodologias aplicadas para

brânquias em diferentes espécies de organismos aquáticos; Realizar precipitação dos GAGs brutos com volumes crescentes de álcool e cetona para recuperar glicosaminoglicanas sulfatadas. Avaliar rendimentos de recuperação com solventes orgânicos; Realizar análises de metacromasia, eletroforese em gel de agarose e infravermelho em amostras de GAGs brutos e frações obtidas(Fa1 e Fc1).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e tratamento da matéria-prima

O cultivo de tilápia do Nilo, *O. niloticus*, foi realizado em sistema de recirculação de água, em tanques de alvenaria, com dimensões 3,00 x 0,80 x 0,85 m, com volume útil de aproximadamente 2 m³, acoplados a um decantador, reator biológico de 500 L e filtro mecânico pressurizado, no período de 01 de maio de 2019 a 27 de junho de 2019 (FERNANDES, 2022), onde dos 282 peixes cultivados, 17 exemplares foram cedidos para a execução deste estudo.

Os peixes despescados foram submetidos à insensibilização percussiva (MAPA, 2022) e posteriormente em gelo, na proporção 1:1,1 kg de biomassa:gelo, utilizando caixas isotérmicas, e transportados imediatamente do abate até o Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura - CEBIAQUA/UFC, do Departamento de Engenharia de Pesca (UFC). Foram utilizadas brânquias removidas de tilápias adultas masculinizadas, obtidas do plantel mantido pela Estação de Aquicultura, Prof^o. Dr. Raimundo Saraiva da Costa, CCA/UFC.

A espécie *O. niloticus* foi catalogada no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio e do Conhecimento Tradicional Associado) sob cadastro AA4816B, com a proposta aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará sob o CEUA nº 6974061020, de responsabilidade do Professor e Doutor Oscar Pacheco Passos Neto e membro de equipe Daniele Ferreira Marques.

No laboratório de Bioquímica Marinha do CEBIAQUA, os animais foram medidos (cm) com régua e pesados (kg) com balança digital, cujos valores médios foram $28,46 \pm 2,51$ cm e $409,14 \pm 95,66$ g, respectivamente, e, em seguida, submetidos à evisceração e procedimento de retirada da brânquia da cavidade opercular com auxílio de faca, alicate e tesoura (FERNANDES, 2022).

Após a etapa de separação do resíduo, o material fresco foi inicialmente lavado com água corrente para remoção de sangue, posteriormente lavado com água destilada e submetido à desidratação por estufa com circulação de ar (45°C; 24 h), como mostra a Figura 4. Em seguida, este foi triturado e armazenado em recipiente fechado de polietileno até a realização das análises experimentais.

Figura 4. Brânquias desidratadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



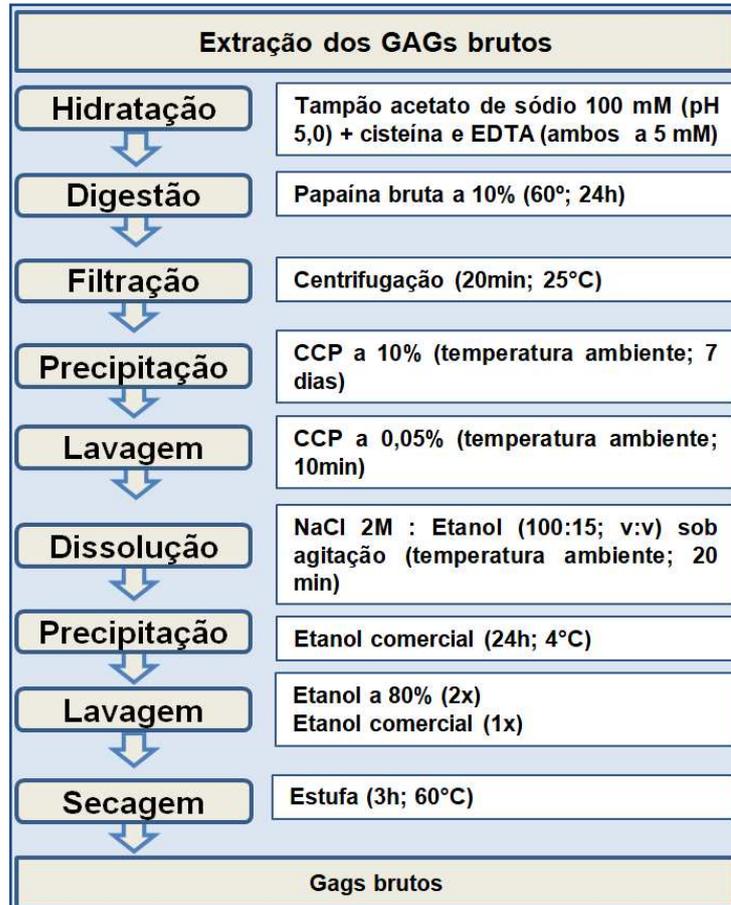
Fonte: Autor (2023)

2.2 Extração dos GAGs

A extração dos GAGs foi realizada a partir de 10 g de amostra de brânquia desidratada e triturada, aplicando digestão com papaína bruta a 10%, em 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH5,0), contendo cisteína e EDTA (ambos a 5 mM) segundo Fernandes (2022) baseado em Rodrigues *et al.* (2009 e 2011) adaptado de Souza *et al.* (2007) e Farias *et al.* (2000). Após 24 horas de incubação em banho-maria a 60°C, o material foi filtrado em tela de náilon (60 μ m), centrifugado (20 min; 7280 \times g) e, ao sobrenadante, foram adicionados 5 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 10%, para precipitação dos GAGs presentes na mistura por 7 dias em temperatura ambiente. Logo após essa etapa, o precipitado foi centrifugado (20 min; 7280 \times g) e o *pellet* obtido foi lavado com 100 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) a 0,05%, centrifugado (20 min; 7280 \times g), posteriormente dissolvido, sob agitação mecânica (20 min; temperatura ambiente), em 50 mL de uma solução de NaCl 2 M: etanol comercial (100:15; v:v) e precipitado com adição de 100 mL de etanol comercial por 24 horas a 4°C. Após centrifugação (20 min; 7280 \times g), o *pellet* obtido foi lavado duas vezes com 100 mL de etanol a 80% e outra com mesmo volume de álcool comercial. Por fim, o material extraído foi levado à estufa (60°C; 3 h) para secagem sob circulação de ar e obtenção dos GAGs brutos

(FIGURA 5). O rendimento (%) foi determinado com base na percentagem da matéria-prima desidratada (n = 3).

Figura 5. Fluxograma de extração de GAGs brutos da brânquia de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).



EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético; CCP - cloreto cetilpiridínio; NaCl - Cloreto de sódio.

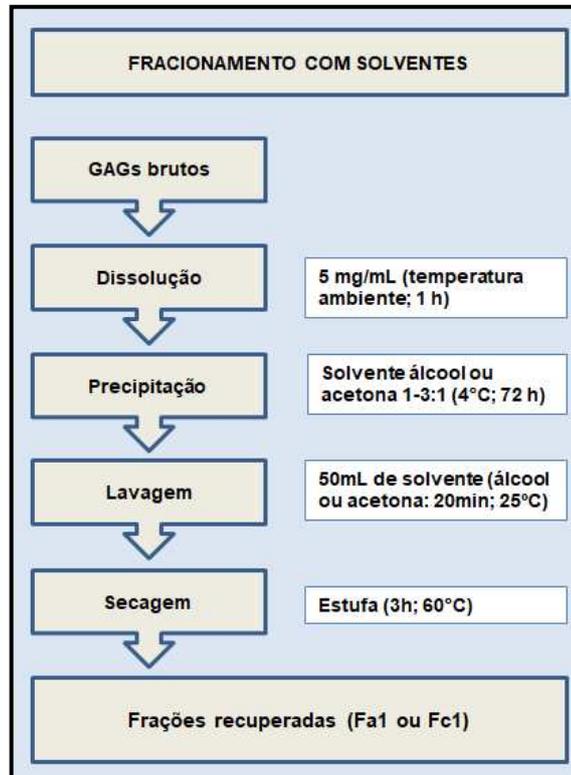
Fonte: Autor (2023)

2.3 Fracionamento dos GAGs brutos por precipitação alcóolica ou cetônica

Para o fracionamento, a amostra de GAGs brutos foi dissolvida em água destilada (5 mg/mL) sob agitação constante (1 h; temperatura ambiente) e volumes crescentes de álcool ou acetona (1-3:1) foram adicionados à solução do material para precipitação dos GAGs por 72 horas a 4°C. Após cada período de precipitação, os GAGs foram centrifugados (20 min; 7280 × g) e, em seguida, lavados com 50 mL do respectivo solvente e novamente centrifugados (20 min; 7280 × g). Ao final desta etapa, o material foi levado à estufa para secagem sob circulação de ar durante 3 horas a 60°C e obtenção das frações.

As frações alcoólicas ou cetônicas, obtidas da precipitação com ambos os solventes orgânicos, foram denominadas de Fa1-3 ou Fc1-3 (FIGURA 6), respectivamente, e o rendimento (%) destas calculado em percentagem com base na amostra de GAGs brutos previamente preparada (n = 3).

Figura 6. Fluxograma de fracionamento dos GAGs brutos por precipitação com solventes.



Fonte: Autor (2023)

2.4 Ensaio de metacromasia

A avaliação da metacromasia das amostras recuperadas (GAGs brutos e fração Fa1 ou Fc1), quanto à presença de sulfatação, dos GAGs obtidos da brânquia de tilápia do Nilo, foi desenvolvida a partir de concentrações crescentes de cada material variando de 9 a 390 µg usando método preparativo em tubos, contendo 1 mL do corante catiônico azul 1,9-dimetilmetileno como indicador de reação pela visualização na cor violeta (FARNDALÉ; SAYERS; BARRETT, 1982; FARNDALÉ; BUTTLE; BARRETT, 1986).

2.5 Análise físico-química de GAGs por eletroforese em gel de agarose

As características físico-químicas das amostras (GAGs brutos e fração Fa1 ou Fc1) foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose, quanto ao padrão de densidade de carga. Os padrões condroitim-6-sulfato (60 kDa), condroitim-4-sulfato (40 kDa), DS e/ou HEP (14 kDa) foram usados para identificação dos GAGs extraídos da brânquia.

A técnica foi realizada com os padrões aplicados em gel de agarose a 0,5%, preparado com o tampão 1,3-acetato diaminopropano a 0,05 M (pH 9,0), e a corrida realizada em voltagem constante (110 V; 1h). Em seguida, os GAGs presentes no gel foram fixados em solução *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio a 0,1% durante 24 horas (DIETRICH; DIETRICH, 1976) e, posteriormente, o gel foi desidratado em estufa sob circulação de ar (60°C; 4 h) (FERNANDES, 2022).

Os GAGs, presentes no gel, foram revelados com o uso de azul de toluidina a 0,1% e, em seguida, o gel foi descorado com solução com etanol absoluto, água destilada e ácido acético (DIETRICH; DIETRICH, 1976; FERNANDES, 2022).

2.6 Análise estrutural dos GAGs por espectroscopia de infravermelho

A pureza química das amostras (GAGs brutos e fração Fa1 ou Fc1), que foram obtidas da brânquia de *O. niloticus*, também 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 KBr, na região espectral de 4000 a 500 cm^{-1} .

2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram expressos como média e desvio-padrão (n=3). Com os valores de rendimento das frações obtidas, foram submetidos ao teste de *t*-Student para dados não-pareados, considerando $p < 0,05$ como significativo. Para análise de dados e representações gráficas foi usado o programa estatístico *Graphpad*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento de GAGs brutos da brânquia de tilápia do Nilo

O protocolo que utiliza a enzima papaína, seguido de precipitações com CCP e álcool, resultou na obtenção de GAGs brutos da brânquia desidratada de tilápia do Nilo, *O. niloticus*. O rendimento, após secagem do material em estufa, foi de $0,91 \pm 0,03\%$, equivalente a $9,1 \pm 0,26$ mg de GAGs brutos por grama de resíduo (TABELA 1).

Tabela 1. Comparação de rendimentos em GAGs brutos de brânquias de diferentes organismos aquáticos.

Espécie	Protocolo	Rendimento (% ou mg g ⁻¹)	Referência
Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	papaína (pH 5,0, 24h, 60°C)	$0,91 \pm 0,03\%^*$ ($9,1 \pm 0,26$ mg g ^{-1**})	Esta pesquisa
Tilápia do Nilo (<i>O. niloticus</i>)	papaína (pH 5,0, 24h, 60°C)	$1,74 \pm 0,05\%^*$	Fernandes (2022)
Atum do Pacífico (<i>Thunnus orientalis</i>)	N-Aman (pH 7,0, 7d, 55°C)	$0,20 \pm 0,00\%^*$	Arima <i>et al.</i> (2013)
Caranguejo (<i>Carcinus maena</i>)	papaína (pH 6,0, 18h, 62°C)	$7,52 \pm 0,51$ mg g ^{-1**}	Regnaut e Durand (1998)

* Rendimento, em porcentagem, sob a base do resíduo desidratado.

** Rendimento expresso em mg de GAGs por grama de resíduo desidratado.

Fonte: Autor (2023)

Quando comparado à pesquisa de Fernandes (2022), que separou e caracterizou previamente o resíduo branquial, em arco e base, desta mesma espécie de tilápia, constatou-se uma diferença importante quanto ao rendimento em GAGs brutos entre tais partes (arco – $1,128 \pm 0,06\%$; base – $0,46 \pm 0,07\%$) que, quando reunidos, totalizaram $1,74 \pm 0,05\%$ extraído da brânquia de *O. niloticus*. Essa quantidade foi, portanto, 1,91 vezes maior que na presente pesquisa, utilizando brânquia inteira, o que pode sinalizar o uso de suas partes como determinandes para recuperar GAGs, de regiões distintas da estrutura desse resíduo, tendo em vista que os peixes foram procedentes do mesmo sistema e período de cultivo (FERNANDES, 2022).

Na Tabela 1, a brânquia de tilápia do Nilo mostrou um rendimento marginalmente superior em GAGs brutos que ao obtido daquela do caranguejo *Carcinus maena* ($7,52 \pm 0,51$ mg em GAGs brutos por grama de resíduo), quando extraídos com papaína (REGNAUT; DURAND,1998). Já a brânquia do atum do

Pacífico (*Thunnus orientalis*), empregando-se a enzima N-Amano, Arima *et al.* (2013) obtiveram $0,20 \pm 0,00\%$ em GAGs brutos, um rendimento 4,55 vezes inferior ao obtido neste estudo. Tais estudos combinados demonstraram que o rendimento em GAGs brutos, de brânquia, varia segundo organismo e protocolo de extração utilizado.

Vale salientar que o resíduo brânquia é uma fonte majoritária em GAGs frente a outras partes geradas da filetagem de tilápia e o aprimoramento na obtenção destes compostos pode viabilizar interesses biotecnológicos (FERNANDES, 2022).

3.2 Rendimento de GAGs brutos fracionados por precipitação alcoólica ou cetônica

Após o processo de extração, amostras de GAGs brutos extraídos foram preparadas em água e, em seguida, avaliadas por solventes orgânicos (álcool ou cetona) quanto a uma possível capacidade destes em fracionar o material por adições de volumes crescentes, sob refrigeração (4°C) por 24 h. A finalidade dessa metodologia alternativa seria para obter GAGs de menor complexidade e a menor custo, desde que a heterogeneidade e a complexidade química dos polissacarídeos sulfatados requerem, tradicionalmente, equipamentos laboratoriais, como colunas cromatográficas de separação usando resinas comerciais acopladas a outros sistemas operacionais, geralmente, de elevado custo de aquisição e necessitando operador qualificado (POMIN; MOURÃO, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2011; SALLES *et al.*, 2017).

O resultado desse processo pode ser observado na Tabela 2 e, em comum, ambos os solventes utilizados mostraram habilidade de somente precipitar GAGs na primeira adição dos respectivos agentes químicos, frações Fa1 e Fc1, cujas frações passaram a ser utilizadas nas análises subsequentes. Enquanto, nas demais adições de ambos os solventes (frações Fa2-3; Fc2-3), não ocasionaram precipitações durante o período avaliado.

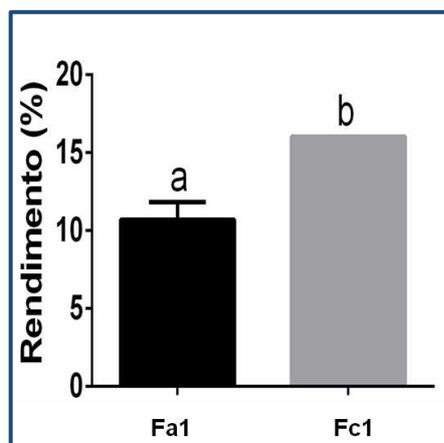
Tabela 2. Comparação de rendimentos de GAGs brutos da brânquia de tilápia do Nilo, após precipitação fracionada com volumes crescentes de álcool ou cetona.

Frações	Rendimento (%) [*]	Quantidade recuperada em GAGs (g) /50 mg de GAGs brutos
Fa1	0,10 ± 0,47%	0,005 ± 0,00 g
Fa2	-	-
Fa3	-	-
Fc1	0,16 ± 0,0%	0,008 ± 0,00 g
Fc2	-	-
Fc3	-	-

* Rendimento, em porcentagem, obtido a partir da solução aquosa previamente preparada de GAGs brutos (5 mg mL⁻¹).; - Material não-recuperado.
Fonte: Autor (2023)

Conforme o Gráfico 1, a obtenção por precipitação alcoólica ou cetônica, do extrato bruto de GAGs extraído da brânquia de tilápia do Nilo, revelou, a partir da solução da amostra preparada em água, uma diferença significativa entre os rendimentos recuperados, cujos percentuais foram 0,10 ± 0,001% e 0,16 ± 0,000% para Fa1 e Fc1, respectivamente, o que corresponderam a 0,005 ± 0,00 e 0,008 ± 0,00 g de GAGs (TABELA 2).

Gráfico 1. Rendimentos de GAGs obtidos por precipitação com álcool (Fa1) ou cetona (Fc1).



Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ao nível 5% (t de Student, $p < 0,005$)
Fonte: Autor (2023)

Esse decréscimo no rendimento em GAGs, após o período de

precipitação e quantificação, já era esperado, haja vista que durante o processo ocorrem interações solvente+molécula, em razão ainda da composição química do material extraído.

Em comportamento por colunas cromatográficas de separação, utilizando resinas de troca-iônica, verifica-se a interação com os grupos sulfatados dos polímeros, os quais são, posteriormente, eluídos por força iônica utilizando o NaCl como fase móvel, resultando na separação de frações distintas em rendimento e composição (SALLES *et al.*, 2017).

A substância orgânica tem sua solubilidade diretamente relacionada com a estrutura molecular (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013). Neste trabalho, acredita-se que o maior poder de recuperação de GAGs, por cetona, pode ser o resultado de uma diferença de polaridade entre os solventes utilizados. Assim, é sabido que tanto o álcool como a cetona é solúvel em água, porém devido a sua forma geométrica semelhante à da água, o solvente cetona apresenta uma solubilidade também importante, podendo ser capaz de interagir com mais propriedade com compostos iônicos (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013).

Estudos apontam que o efeito na recuperação de polissacarídeos extraídos varia segundo o solvente utilizado. Por exemplo, Vidal *et al.* (2010) mostraram que na extração de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* (C. Agardh) Kützing, do filo Ochrophyta, a cetona apresentou maior eficácia do que o uso de metanol e etanol, pois concentrou por precipitação uma maior quantidade de carboidratos presentes na referida espécie de alga. Além de separar o material as três fucanas, sintetizadas pela alga, foram caracterizadas como ricas em vários açúcares (xiloglucoranofucana e galactofucanas), fato não observado pelos demais solventes citados.

Mais recentemente, Abbou *et al.* (2019) avaliaram o efeito do emprego de três solventes orgânicos (álcool, acetona e propanol) sobre o rendimento de polissacarídeos extraídos de sementes obtidas do pinheiro de Alepo (*Pinus halepensis* Mill.). Os autores observaram que o rendimento dependeu do solvente utilizado e da composição química dos grãos, os quais apresentaram baixos níveis de açúcares. O estudo revelou que tanto a precipitação alcoólica quanto a cetônica foram eficazes para obter quantidades equivalentes de polissacarídeos de *P. halepensis*.

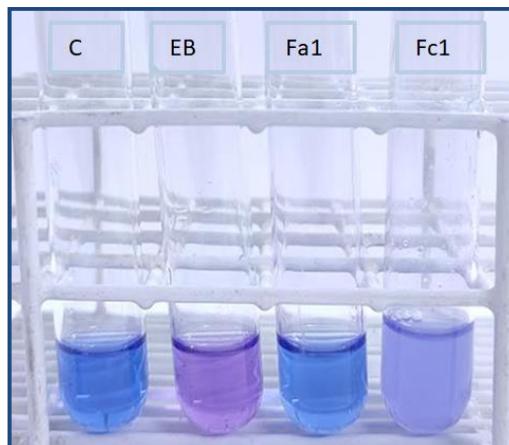
3.3 Análise metacromática preliminar de sulfatação

O ensaio metacromático foi realizado com as amostras (GAGs brutos, Fa1 ou Fc1), para verificação inicial de sulfatação com uso do corante azul 1,9-dimetilmetileno como indicador colorimétrico (FARNDALÉ; SAYERS; BARRETT, 1982; FARNDALÉ; BUTTLE; BARRETT, 1986), conforme figura 7.

Das amostras avaliadas, a presença de cor violeta (metacromasia) foi observada somente para a de GAGs brutos, com adição material dissolvido (9 µg). A formação de complexo ocorreu discretamente na fração Fc1 com a adição material dissolvido (390 µg), enquanto ausente na Fa1 com a mesma adição de material que a fração anterior.

Visualmente, revelou-se que a Fc1 possui distinta composição química frente os GAGs brutos que apresentaram intensa propriedade aniônica (sulfatação) no ensaio, ou seja, cerca de 43 vezes inferior a quantidade de amostra para revelar metacromasia

Figura 7. Teste de metacromasia usando os GAGs brutos e as frações (Fa1 e Fc1) na presença do azul 1,9-dimetilmetileno. C: controle; EB: extrato bruto; Fa1: fração alcoólica; Fc1: fração cetônica.



Fonte: Atutor (2023)

Fernandes (2022) detectou GAGs sulfatados em extrato bruto de GAGs extraído da brânquia de tilápia do Nilo, separando-o em arco e base, que, na ocasião, o arco branquial apresentou reação metacromática importante, sendo necessário uma quantidade menor de amostra de GAGs que a base branquial para

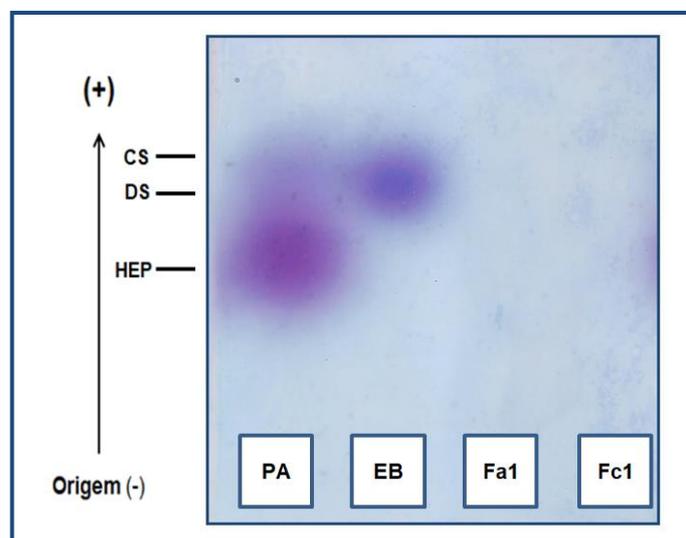
detecção da coloração violeta, cuja quantidade de amostra foi duas vezes maior.

Os GAGs diferenciam entre si por vários aspectos químicos como, por exemplo, pelo grau de sulfatação (GESTEIRA, 2011). O resultado observado na Figura 7, que mostrou ausência de metacromasia nas amostras das frações avaliadas, sugere que ambos os solventes utilizados (álcool ou acetona), para recuperação dos materiais dissolvidos em água, ocasionaram, também, uma redução do poder aniônico da molécula comparado ao extrato nativo, haja vista que o corante catiônico azul 1,9-dimetilmetileno forma complexo com GAGs sulfatados (FARNDAL; SAYERS; BARRETT, 1982; FARNDAL; BUTTLE; BARRET, 1986).

3.4 Caracterização por eletroforese em gel de agarose

O perfil eletroforético em gel de agarose (0,5%) apresentou uma diferença drástica na revelação entre as amostras avaliadas (FIGURA 8) e reforçou a análise metacromática mostrada anteriormente na Figura 7. Após tratamento com o corante catiônico azul de toluidina, o gel revelou banda metacromática homogênea apenas de GAGs brutos, comigrando como CS padrão e apresentando densidade de carga importante (FIGURA 8), sugerindo a presença de radicais sulfatados na estrutura química das moléculas na amostra avaliada (ROTH *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2011; FERNANDES, 2022).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (0,5%) de GAGs obtidos da brânquia de *O niloticus*.



Fonte: Autor (2023)

De fato, utilizando-se da mesma técnica, Fernandes (2022) também sugeriu, após o gel revelado com azul de toluidina, o GAG CS como presente na brânquia (arco e base) de tilápia do Nilo. Mais relevante, a autora ainda descreveu uma propriedade metacromática mais importante dos GAGs localizados na região da base desse resíduo, demonstrando uma composição de sulfatação distinta do GAG CS na estrutura branquial deste teleósteo dulcícola.

Já para as frações (Fa1 e Fc1), a técnica de revelação não indicou, por meio da caracterização violeta, formação de complexo colorimérico (GAG+corante azul de toluidina). Somado a isso, durante a corrida eletroforética, a essa ausência no gel de GAGs sulfatados nas frações Fa1 e Fc1, foi possivelmente decorrente da carência de interação com a diamina presente no tampão de corrida utilizado, cujo componente forma naturalmente complexo com polímeros aniônicos (DIETRICH; DIETRICH, 1976). Diferentemente do perfil metacromático visualizado dos GAGs brutos (FIGURA 8) e anteriormente caracterizado por Fernandes (2022).

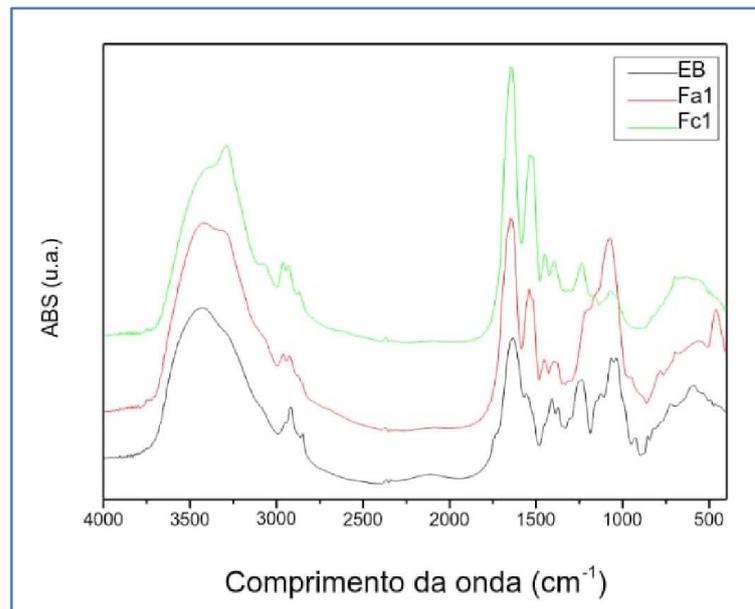
3.5 Análise estrutural dos GAGs por espectroscopia de infravermelho

Os espectros de infravermelho (IV) caracterizaram as três diferentes amostras analisadas como compostos quimicamente diferentes entre si, como observados claramente no Gráfico 2. Essas diferenças foram evidentes entre os perfis apresentados para as frações Fa1 e Fc1 comparando-as a amostra de GAGs brutos, tanto pela intensidade dos sinais químicos como pela ausência de alguns deles, especialmente entre as regiões compreendidas de 800 a 1250 cm^{-1} , nas quais também ocorrem resíduos de ácido urônicos e picos de sulfatação (JRIDI *et al.*, 2019; DHAHRI *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.* 2021; FERNANDES, 2022).

Em geral, vibrações químicas das amostras revelaram grupos funcionais característicos a GAGs sulfatados, com estiramentos de sinais de intensidade variável. Os espectros de janela de 4000 a 500 cm^{-1} revelaram regiões de sinais de 3433 a 536 cm^{-1} , para extrato bruto (EB) de GAGs, de 3421 a 460 cm^{-1} , para Fa1, e de 3286 a 700 cm^{-1} , para Fc1. Esses perfis de resolução de janelas de sinais variáveis apontaram para a obtenção de materiais com estruturas moleculares diferentes (GRÁFICO 2).

De fato, analisando potualmente cada espectro obtido, foi possível confirmar a ocorrência no extrato bruto (EB) de GAGs CS na brânquia de *O. niloticus* (FERNANDES, 2022), cujas bandas principais de absorção foram 3433, 1639, 1558, 1377, 1128 cm^{-1} e 1064 cm^{-1} , além de sinais de sulfatação em 1242, 854 e 819 cm^{-1} , cujos os dois últimos foram relativos ao C-4-S e C-6-S, respectivamente, como listados na Tabela 3.

Gráfico 2. Espectros de infravermelho de GAGs brutos (EB) e frações (Fa1 e Fc1) usando partilhas de KBr.



Fonte: Autor (2023)

Tabela 3. Sinais de IV de extrato bruto (EB) de GAGs, de fração alcóolica (Fa1) e de fração cetônica (Fc1) obtidos da brânquia de tilápia do Nilo.

Fração	Sinal (cm^{-1})	Grupo químico	Referência
EB	3433	-OH	1,3 e 7.
	2922	C-H	2 e 7.
	1639	Amida-I -OH	1, 3, 4, e 7.
	1558	Amida-II, -OH	1 e 3
	1413	O-C=O	4
	1377	Ácidos urônicos	2, 3, e 6.
	1242	S=O	1, 2, e 3.
	1128	C-O-C, C-OH e C-C	1, 2, 3 e 7.
	1064	C-O-C, C-OH e C-C	1, 2, 3 e 7.
	1037	C-O-C	4
	925	(-SO ₃ ⁻)	5
	854	C-O-S (C-4-S)	6 e 7.

	819	C-O-S (C-6-S)	7
	3421	-OH	1,3 e 7.
	2927	C-H	2 e 7
	1651	Amida-I,-OH	1,3 e 7.
	1555	Amida-II,-OH	1 e 3.
Fa1	1541	C=O (CH ₃ CO- NH), NH (CH ₃ CO- NH -)	1 e 3.
	1452	C-N, ácidos urônicos, C-O, N-H, COO- do ácido glucurônico	1,2,3 e 8.
	1080	C-O-C, C-OH, C-C	1,2,3 e 7.
	3286	-OH	1,3 e 7.
Fc1	2927	C-H, CH ₂	2 e 7
	2873	CH ₂	2 e 7
	1649	Amida -I, -OH	1,3 e 7.
	1539	C=O (CH ₃ CO- NH), NH (CH ₃ CO- NH -)	2 e 7
	1452	C=O (CH ₃ CO- NH), NH (CH ₃ CO- NH -)	1,2,3 e 8.
	1234	S=O	1,2,3 e 6.
	1070	C-O-C, C-OH, C-C	1,2,3 e 7.
	833	C-O-S (C-6-S)	6

¹ Dhahri *et al.* (2010); ² Dhahri *et al.* (2020); ³ Jridi *et al.* (2019); ⁴ Mansour *et al.* (2010); ⁵ Melo *et al.* (2002); ⁶ Oliveira *et al.* (2017); ⁷ Pereira *et al.* (2021); ⁸ Wu *et al.* (2010).
Fonte: Autor (2023)

Quanto à análise comparativa por IV das frações, regiões espectrais foram encontradas para amida (1651 e 1555 cm⁻¹, N-H), ácidos urônicos, N-H COO-, ácido glucurônico e ligações glicosídicas, porém com ausência de éster sulfato (S=O), para Fa1. Já para Fc1, observou-se pico característico de sulfatação em 1234 cm⁻¹, além de CH na região espectral de 2927 cm⁻¹, C-N, ácidos urônicos C-O, N-H COO- do ácido glucurônico na banda 1452 cm⁻¹, C-O-C, C-OH e C-C na banda 1070 cm⁻¹, e um ombro discreto sugestivo em 833 cm⁻¹ (C-O-S), especulando uma concentração baixa de C-6-S na amostra avaliada baseado em Oliveira *et al.* (2017).

Portanto, em geral, os resultados encontrados neste estudo apoiaram às análises bioquímicas anteriores (FIGURAS 7 e 8), demonstrando, claramente, a técnica de infravermelho como importante para caracterização mais refinada das amostras. Essa comparação físico-química residiu na observação de que o uso de cetona como um agente seletivo para obtenção de GAGs sulfatados, interagindo com os grupos funcionais do polímero extraído da brânquia de *O. niloticus*. Enquanto, com o uso de álcool, não se observou no material recuperado sinais característicos para GAGs sulfatados.

Abbou *et al.* (2019), com pesquisas de sementes de pinheiro de alepo (*P. halepensis Mill.*), informaram que os grupos OH, CH, COO, COO, OCH₃, bem como aqueles de sulfato, ácido urônico e ligações glicosídicas mostraram-se em proporções diferentes em extratos polissacarídicos quando obtidos com álcool, acetona ou propanol). Essa diferença pode ser o resultado da quantidade e localização desses grupos no material estudado.

A Tabela 4 resume a identidade química de GAGs encontrada na brânquia de *O. niloticus* e quando comparando-se o emprego de solventes orgânicos (álcool ou cetona) como metodologia alternativa para obter GAGs sulfatados quanto a pureza.

Tabela 4. Sinais espectrais característicos de GAGs CS.

Amostras	Sinal espectral (cm ⁻¹)	GAGs
Extrato bruto	1242 (S=O)	C-4/6-S
	854 (C-O-S)	
	819 (C-O-S)	
Fa1	-	-
Fc1	1234 (S=O)	C-6-S
	833 (C-O-S)	

- Material não identificado como GAG sulfatado.

Fonte: Autor (2023)

Em suma, os resultados combinados desta pesquisa sugerem que os GAGs extraídos da brânquia de *O. niloticus*, aplicando uma metodologia que utilizada cetona como agente precipitante, possam vir a ser relevantes para um melhor conhecimento da sua estrutura química. Essa perspectiva é muito importante, haja vista que os estudos de biologia estrutural de polissacarídeos sulfatados envolvem métodos químicos (ácidos e bases), geralmente laboriosos e que levam maiores riscos à saúde humana e ao meio ambiente (POMIN; MOURÃO, 2008).

4 CONCLUSÕES

A realização da presente pesquisa permitiu-nos as seguintes conclusões:

- A brânquia inteira desidratada de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), quando digerida com papaína, ocasionou uma quantidade em glicosaminoglicanos inferior ao de suas partes (arco e base), baseado em estudo anterior utilizando o resíduo dessa espécie de peixe, quando cultivada no mesmo período, em tanques de alvenaria com recirculação de água.
- O protocolo realizado para extração de GAGs da brânquia de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a, obteve rendimentos superior aos rendimentos de extração de GAGs da brânquia da espécie *Thunnus orientallis* (atum do Pacífico) e demonstrou rendimento 4,55 vezes inferior aos obtidos na extração de GAGs da brânquia do caranquejo *Carcinus maena*.
- A metodologia que utiliza a precipitação com volumes crescentes de álcool ou cetona mostrou-se de baixa eficácia para recuperar frações ricas em glicosaminoglicanos sulfatados segundo as técnicas bioquímicas empregadas.
- Por outro lado, por espectroscopia de infravermelho, observou-se que o uso de cetona sugeriu o solvente orgânico com poder de concentrar por precipitação o glicosaminoglicano do tipo condroitim-6-sulfato, o qual participa da cadeia de glicosaminoglicanos (condroitim-4/-6-sulfato) encontrada na estrutura branquial de *O. Niloticus*.
- Os resultados apontaram que o emprego de uma metodologia simples e de menor custo pode vir a ser uma alternativa para obter glicosaminoglicanos da brânquia de *O. niloticus*, com a finalidade de conhecer melhor a estrutura química do condroitim sulfato.

REFERÊNCIAS

- ABBOU, A. *et al.* **Effect of precipitation solvent on some biological activities of polysaccharides from *Pinus halepensis* Mill.** Seeds. International Journal of Biological Macromolecules, v141, p. 663-670, 2019.
- 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.
- ALCÂNTARA, L. O.; SOUSA, J. R. de; ANDRADE, K.; TEIXEIRA, E. H.; CERQUEIRA, M. A.; SILVA, A. L. C. da; FILHO, M. de S. M. S.; SOUZA, B. W. **Extraction and characterization of hyaluronic acid from the eyeball of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).** International Journal of Biological Macromolecules, v. 226, p.172-183, 2022.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 sea snake (*Lapemis curtus*): extraction, structural characterization and antioxidant activity.** Marine Drugs, v. 16, n. 5, p. 1-14, 2018.
- BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. **Industrialização de tilápias.** GFM Gráfica & Editora, Toledo, 2007.
- BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A. A.; COLDEBELLA, A.; BUENO, G. W.; FEIDEN, A. **Rações orgânicas suplementadas com farinha de resíduos de peixe para juvenis da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** Revista Ciência Agronômica, v. 41, n. 4, p. 686-692, out-dez, 2010.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual abate humanitário de peixes.** Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt->

br/assuntos/producao-animal/arquivos-publicacoes-bem-estar-animal/Manual_3_Abate_Humanitario_peixes_ISBN.pdf/view. Acesso em 30 de jun. 2023.

CARRETERO, M. E., **Estudos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como bioindicadores da poluição por mercúrio nos lagos do parque do Ibirapuera e do Parque Ecológico do Tietê na Grande São Paulo**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

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

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 Coagulation Fibrinolysis*, v. 21, p. 547–557, 2010.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. **Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers**. *Analytical Biochemistry*, v. 70, n. 02, p. 645-647, 1976.

FAO (2020) - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, 2020.

FAO (2022) - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma, 2022.

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.

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

FERNANDES, Francisca Geny Marfim. **Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como fonte de resíduos para extração de glicosaminoglicanos antioxidantes**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2022.

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.

GARNJANAGOONCHORN, W.; WONGEKALALA, L.; ENKAGUL, A. **Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage**.

Chemical Engineering and processing: Process Intensification, v. 46(5), p. 465-471, 2006.

GAVVA, C.; PATEL, K.; KUDRE, T.; SHARAN, K.; CHIKUNDA, D NANDINI. **Glicosaminoglicanos do descarte do processamento de peixes de água doce - Isolamento, caracterização estrutural e atividade osteogênica.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 123, p. 558-467, 2019.

GESTEIRA, T. F. **Biossíntese de glicosaminoglicanos sulfatados: novos enfoques para o estudo de atividades e interações das enzimas do golgi.** Tese (doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Bioquímica, São Paulo, 2011.

GODOY, L. C.; FRANCO, M. L. R. S.; FRANCO, N. P.; SILVA, A. F.; ASSIS, M. F.; SOUZA, N. E.; MATSHUSHITA, M.; VISENTATINER, J. V. **Análise sensorial de caldos e canjas elaborados com farinha de carcaças de peixe defumadas: aplicação na merenda escolar.** Ciência & Tecnologia de Alimentos, Campinas, n. 30, p. 86-89, 2010.

IGARASHI, M.A. **Aspectos técnicos e econômicos do cultivo de Tilápias em tanques-rede no Brasil e perspectivas de desenvolvimento da atividade no Nordeste Brasileiro.** Revista Econômica do Nordeste, Fortaleza, v. 34, n. 1, jan-mar. 2003.

JRIDI, Mourad.; NASRI, Rim.; MARZOUG, Zeineb.; ABDELHEDI, Ola.; HAMD, Marwa.; NASRI, Moncef. **Characterization and assessment of antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides extracted from cuttlefish skin and muscle.** International Journal Biological Macromolecules, v. 123, p. 1221 - 1228, 2019.

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.

LAMOUREUX F.; BAUD'HUIN M.; DUPLOMB L.; HEYMANN D.; REDINI F. **Proteoglycans: Key partners in bone cell biology.** Bioessays. PubMed. Ed. 2. p. 758-771, 2007.

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

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. **Solubilidade das substâncias orgânicas.** Quim. Nova, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013

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.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para laboratório – Princípios e interpretações.** 5. ed. Medbook, 2009

MOURA, H. C. De. **Obtenção de glicosaminoglicanos de escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*)** – Dissertação (mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Mestrado em tecnologia de alimentos, Londrina, 2020.

NASCIMENTO, R. P.; PEREIRA, V.A.; ALMEIDA-MONTEIRO, P. S.; SALES, Y. S.; ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; COSTA, T. O.; OLIVEIRA, A. G.; MONTENEGRO, A. R.; ALMITO-VANDERLEY, C. S. B. **Use of glycosaminoglycans from *Oreochromis niloticus* skin as an antioxidant supplement for milt cryopreservation of Brazilian bocachico.** Seminário de Ciências Agrárias, Londrina, v.42, n.5, p. 2959, 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.

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 os chondroitin sulfate extracted of tilápia (*Oreochromis niloticus*) processing.** Procedia Engineering, v. 200, p. 193-199, 2017.

OLIVEIRA, Andressa Gomes de. **Pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como fonte de glicosaminoglicanos antioxidantes.** Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2020.

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.

PEDROZA FILHO, Manoel; ROCH, Hainnan. **Anuário Peixe BR da Psicultura 2021.** <https://www.peixebr.com.br/anuario-2021/>. Acesso em 16 de mar. de 2023.

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. G.; FEITOSA, J. P. M.; SOARES, S. A.; MONTENEGRO, A. R.; VANDERLEY, C. S. S. **The effect of glycosaminoglycans, extracted from the skin of tilapia, in the sperm freezing medium of *Collossoma macropomum*.** Cryo Letters, v. 42, n.5, p. 272-282, 2021.

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 Niletilapia skin sulfated polysaccharides for freezing of *Colossoma macropomum* (Characiformes: Serrasalminidae) semen.** *Aquaculture*, v.528, p. 735-553, 2020.
- PINTO, B. V. V.; BEZERRA, A. E.; AMORIM, E.; VALADÃO, R. C.; OLIVEIRA, G. M. **O resíduo do pescado e o uso sustentável na elaboração de coprodutos.** *Revista Mundi*, v. 2, n. 2, p. 15, 2017.
- POMIN, V. H.; MOURÃO, P.A.S. **Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans.** *Glycobiology*. p. 1016-1027, 2008.
- 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*, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- 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 algamarinha verde *Caulerpa racemosa*.** *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca, São Luís*, v. 4, n. 1, p. 32-43, 2009.
- 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, 2011.
- 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.
- ROSA, M. J. S. **Aproveitamento integral dos resíduos da filetagem de tilápia e avaliação do impacto.** Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2009.
- ROTH, M.; PAPAKONSTANTINO, E.; KARAKIULAKIS, G.. **Biological function of glycosaminoglycans.** *In: Garg, H. G.; Cowman, M. K.; Hales, C. A. Carbohydrate chemistry, biology and medical applications.* Elsevier, p. 209-226, 2008.
- SALLES, T. C.; RODRIGUES, J. A. G.; BARCELLOS, P. G.; AMARAL, G. F.; FRASER, J. *et al.* **Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover.**

Journal International Medical, Baltimore, v. 242, n. 1, p. 27-33, 1997.

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.

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.

SIES, H., STAHL, W. **Vitamins E and C, carotene, and other carotenoids as antioxidants**. American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SILVA, G. F., MACIEL, L. M., DALMASS, M. V., GONÇALVES, M. T. **Tilápia-do-Nilo: Criação e cultivo em viveiros no estado do Paraná**. GIA, Curitiba, 2015.

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

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

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

VALCARCEL, J.; NOVOA-CARBALLAL, R.; PEREZ-MARTIN, R. I.; REIS, R. L.; VAZQUEZ, J. A. **Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents**. *Biotechnology Advances*. v. 35, p. 711-725, 2017.

VIDAL, A. A. J.; NOBRE, L. T. D. B.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. D.; ROCHA, H. A. O. **Comparação do efeito de diferentes solventes no fracionamento de polissacarídeos sulfatados da alga parda *Spatoglossum schroederi* (C. Agardh) Kützing**. PublCa. v. I, p. 46 – 54, 2010.

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.

XIMENES, Luciano Feijão. **Produção de pescado no Brasil e no Nordeste brasileiro**. Banco do Nordeste do Brasil. Caderno Setorial ETENE, ano 5, n.150.,

Fortaleza, 2021.

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