



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DE BARBELA DE PERU (*Meleagris gallopavo*) E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES BIOATIVAS  
EVELLIN BALBINOT ALFARO

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de doutora em Engenharia  
e Ciência de Alimentos.

Dr. CARLOS PRENTICE HERNÁNDEZ (*in memoriam*)

Orientador

Dra. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS

Orientadora

Dr. CLÁUDIO ROBERTO NOVELLO

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DA BARBELA DE PERU (*Meleagris gallopavo*) E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES BIOATIVAS  
EVELLIN BALBINOT ALFARO

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do  
título de doutora em Engenharia  
e Ciência de Alimentos.

Dr. CARLOS PRENTICE HERNÁNDEZ (*in memoriam*)

Orientador

Dra. VILÁSIA GUIMARÃES MARTINS

Orientadora

Dr. CLÁUDIO ROBERTO NOVELLO

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

## Ficha Catalográfica

A385o Alfaro, Evellin Balbinot.  
Obtenção de glicosaminoglicanos da barbela de peru (*Meleagris gallopavo*) e avaliação de suas propriedades bioativas / Evellin Balbinot Alfaro. – 2020.  
92 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientador: Dr. Carlos Prentice Hernández (*in memoriam*).

Orientadora: Dra. Vilásia Guimarães Martins.

Coorientador: Dr. Cláudio Roberto Novello.

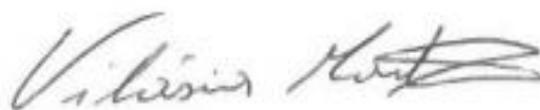
1. Subprodutos 2. Ácido Hialurônico 3. Sulfato de Dermatana  
4. Sulfato de Condroitina 5. Anticoagulante 6. Antiproliferativa  
I. Hernández, Carlos Prentice II. Martins, Vilásia Guimarães  
III. Novello, Cláudio Roberto IV. Título.

CDU 338.45

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

## APROVAÇÃO

Tese defendida por Evellin Balbinot Alfaro, e aprovada em 27 de novembro de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



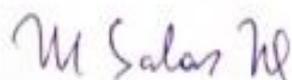
---

Profa. Dra. Vilásia Guimarães Martins - FURG



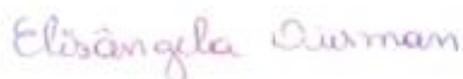
---

Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong – FURG



---

Profa. Dra. Myriam Salas Mellado – FURG



---

Profa. Dra. Elisângela Dusman – UTFPR



*“Este trabalho de pesquisa é inteiramente dedicado ao meu pai Jacyr Balbinot (in memoriam), um grande incentivador e modelo de perseverança. Ao meu esposo Alexandre Alfaro, uma fonte inesgotável de apoio e exemplo de resiliência. Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Prentice (in memoriam), pela dedicação, por ter sido um pilar de sustentação e um constante incentivador ao longo de todo o projeto”.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Sra Aparecida, por me sustentarem durante todo o caminho e por serem luz nos momentos de dúvida.

Aos meus pais Jacyr Balbinot (*in memoriam*) e Marlene Balbinot, pela vida que me proporcionaram, amor, educação profissional e dedicação.

Ao meu amado irmão Orlando Balbinot, por todo o carinho, apoio e pelas sábias palavras de incentivo.

Ao meu amado esposo Alexandre Alfaro, pelo companheirismo, cumplicidade, força, apoio técnico e por ser o grande motivador na realização deste sonho.

A todo o carinho, incentivo e orações recebidos das famílias Balbinot, Antunes, Da Trindade e Alfaro, obrigada pela compreensão com minhas ausências.

Aos amigos Mônica, Edite, Rosemary, Ana Clara, Edinara, Luciano, Daniele, Fernando, Eduardo, Ticiane, Juan, Andréa, Anilton, Nara, Deise, Adelina, Odete, obrigada pelos momentos de descontração e pelo apoio durante esta caminhada.

Ao Luiz Carlos Sarará por ser um amigo e grande motivador da corrida de rua, obrigada.

Aos amigos que a cidade de Rio Grande me presenteou, Rosângela, Milene, Rogério, Bento Sabrina, Rogerinho e Márcio, obrigada pela acolhida pelo carinho e por serem minha família gaúcha. Agradeço a todos do grupo São João Batista, pelos bons momentos.

À Rosângela Thurmer, por todo o carinho, sempre com um caloroso abraço e contagiante sorriso, que se tornou uma mãe de coração, obrigada por tudo que fez por mim.

À minha irmã Milene Thurmer, pelas valiosas conversas, palavras de força, fé, amizade e bons momentos.

Ao Padre Giribone, meu grande amigo e pai de coração, pelos direcionamentos espirituais.

À Joice Mota e Carolina Herrera, obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração.

Às minhas amadas amigas e confidentes intelectuais e pessoais Danielle Rubin e Meritaine da Rocha, obrigada pelo carinho, apoio técnico e estímulo de sempre.

Às carinhosas amigas Viviane, Paola e Débora, obrigada pelos abraços e bons momentos.

Meu agradecimento especial, à Pós-doc Juliana Latorres, e à técnica de laboratório Aline Massia, por toda amizade e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de tecnologia de alimentos, Camila, Helena, Alan, Sibebe, Karina, Gisele, Cláudio, Daiana, Mariane, Andressa, Patrícia, Simone, Luan, José, Luana, Carolina, Vanessa, Caio, pelos bons momentos compartilhados.

Ao Wesclen, Priscila, Verônica e Guilherme pela amizade e bons momentos compartilhados.

Meu especial agradecimento aos laboratoristas da coordenação de extensão experimental (COEXP -UTFPR) João, Ronaldo, Raquel, Camila, Magali e Sinara, por todo o auxílio técnico no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Gustavo Longhi, Gustavo Almeida e Raul Messi pela amizade e auxílio durante os experimentos.

À prof<sup>a</sup> Dra. Maria Helene Canteri da UTFPR, pelos equipamentos para a realização da análise e pelo auxílio.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Elisângela Düsman da UTFPR, por toda a ajuda e colaboração durante a execução das análises em seu laboratório.

Ao prof<sup>o</sup>. Dr. Thales Cirpriani e a Dra. Helyn Barddal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelo espaço ofertado para a realização das análises.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Verônica Vicentini e ao prof. Dr. Igor de Almeida da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo espaço ofertado para a realização das análises.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Cláudio Roberto Novello da UTFPR, por aceitar este grande desafio e me receber em seu laboratório, pela valiosa contribuição, orientação e ensinamentos, obrigada pela amizade, pelas sinceras conversas e incentivo de sempre.

Ao meu estimado orientador prof. Dr. Carlos Prentice (*in memoriam*), que sempre foi um grande entusiasta e que me motivou desde o início a traçar planos mais ousados e a sair da zona de conforto, mesmo sendo este trabalho pioneiro em nosso laboratório, sempre acreditando, apoiando-me e orientando-me, obrigada pelos ensinamentos. Sou muito grata à Deus por ter lhe conhecido e sido orientada pelo Senhor.

À minha orientadora prof<sup>a</sup>. Dra. Vilásia Martins, por aceitar me orientar na conclusão deste trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, apoio técnico, compreensão e amizade.

Agradeço ao Centro Integrado de Análises (CIA-FURG), em especial ao Diego e a Rosemari, pelas análises de RMN.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* de Francisco Beltrão-PR, pela parceria no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, prof<sup>a</sup>. Dra. Eliana, prof<sup>a</sup>. Dra. Elisângela e prof<sup>a</sup>. Dra. Myriam.

Agradeço ao CAPES, pelo consentimento da bolsa.

E, por fim, agradeço à Universidade Federal de Rio Grande e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos pela oportunidade e a todos os professores que me concederam um ensino de qualidade e contribuíram para o meu desenvolvimento profissional.

## RESUMO

A demanda global por alimentos cresce em ritmo acelerado e o setor industrial acompanha este crescimento com o processamento de alimentos e, em consequência, há um aumento na geração de subprodutos. Dentre as indústrias em expansão, está a indústria de processamento de peru, sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial gerando toneladas de subprodutos anualmente. A barbeta de peru é um dos subprodutos de baixo valor econômico, com potencial para a extração de glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs são polissacarídeos de cadeias longas que se dividem em sulfatados e não sulfatados, sendo estes, sulfato de condroitina, sulfato de heparana, sulfato de dermatana, sulfato de heparina, sulfato de queratana e, o único não sulfatado do grupo, o ácido hialurônico. Os GAGs podem ser obtidos de todos os tecidos animais, através de um processo de extração complexo, com baixo rendimento e alto valor agregado. Por serem potencialmente bioativos, os GAGs são produtos de grande interesse farmacológico. Neste trabalho objetivou-se a extração, purificação, caracterização e avaliação da bioatividade de glicosaminoglicanos isolados da barbeta de peru (*Meleagris gallopavo*). As amostras foram deslipídadas, secas e submetidas a digestão proteolítica com papaína e posterior precipitação dos GAGs com cloreto de cetilpiridínio (CPC), dando origem aos GAGs totais. Estes, por sua vez, foram fracionados por cromatografia de troca iônica eluída em gradiente linear de NaCl (0,25 a 4,00 M) e as frações obtidas foram caracterizadas por RMN uni e bidimensional. Duas frações mostraram a presença de GAGs, sendo que a F-V foi caracterizada como sendo ácido hialurônico e a F-VII apresentou cadeias de sulfato de condroitina 4 e 6 e sulfato de dermatana. Foram determinados a viscosidade, massa molar e rendimento da F-V. Os GAGs totais e as frações F-V e F-VII foram avaliadas quanto ao potencial anticoagulante *in vitro*, inibição anticoagulante com protamina e atividade citotóxica/antiproliferativa frente às células HepG2/C3A e 786-0, derivadas de carcinomas humanos hepatocelular e adeno renal, respectivamente. O ácido hialurônico encontrado na barbeta de peru, apresentou concentração de 11,7 µg/mg tecido seco, com massa molar de  $1,0 \times 10^6$  kDa, e mostrou evidente efeito citotóxico/antiproliferativo frente às células de hepatoma humano. Os polissacarídeos da F-VII apresentaram atividade anticoagulante *in vitro* e efeito inibitório anticoagulante com protamina e também, apresentaram efeito citotóxico/antiproliferativo frente às células 786-0. Os GAGs totais demonstraram alta citotoxicidade para as células HepG2/C3A e 786-0, em todos os tempos de avaliação (24, 48 e 72 h). Desta forma, a barbeta de peru pode ser considerada uma nova fonte de ácido hialurônico e sulfato de condroitina, com potencial aplicação nas áreas médica e farmacêutica.

Palavras chaves: Subprodutos. Ácido hialurônico. Sulfato de dermatana. Sulfato de condroitina. Anticoagulante. Antiproliferativa.



## ABSTRACT

### EXTRACTION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF GLYCOSAMINOGLICANS FROM BARBELA IN PERU (*Meleagris gallopavo*)

The global demand for food grows at a fast pace and the industrial sector follows this growth with food processing and, as a result, there is an increase in the generation of by-products. Among the expanding industries, there is the turkey processing industry, with Brazil being the third largest producer in the world and thus generating tons of by-products annually. The turkey dewlap is one of the by-products of low economic value, with potential for the extraction of glycosaminoglycans (GAGs). GAGs are long-chain polysaccharides that are divided into sulphates and non-sulphates, namely chondroitin sulphate, heparan sulphate, dermatan sulphate, heparin sulphate and the only non-sulphate of the hyaluronic acid group. GAGs can be removed from all animal tissues, the extraction process is complex, with low yield and high added value. GAGs are products of great pharmacological interest, as they are potentially bioactive. This work aimed to extract, purify, characterize and evaluate the bioactivity of glycosaminoglycans granted from turkey dewlap (*Meleagris gallopavo*). The prey was delipidated, dried and subjected to proteolytic digestion with papain and subsequent separation of the GAGs with cetylpyridinium chloride (CPC), giving rise to the total GAGs. The total GAGs were fractionated by ion exchange chromatography eluted in a linear gradient of NaCl (0.25 to 4.00 M) and as fractions were characterized by uni and bidimensional NMR. Two strong fractions were the presence of glycosaminoglycans, one F-V was characterized as hyaluronic acid and one F-VII presented chondroitin sulfate A and C chains and dermatan sulfate. The viscosity, molar mass and F-V yield were determined. The total GAGs and the FV and F-VII fractions were evaluated for anticoagulant potential in vitro, anticoagulant inhibition with protamine and cytotoxic / antitumor activity against HepG2 / C3A and 786-0 cells, derived from human hepatocellular carcinomas and renal adeno, respectively. The hyaluronic acid found in the turkey dewlap, showing a concentration of 11.7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  dry tissue, with a molar mass of  $1.0 \times 10^6$  kDa, and the cytotoxic / antitumor effect on human hepatoma cells is evident. The polysaccharides of F-VII anticoagulant activity in vitro and inhibitory anticoagulant effect with protamine, also, cytotoxic / antitumor effect against 786-0 cells. The total GAGs, demonstrated high toxicity, before the two cell groups, HepG2 / C3A and 786-0, at all times (24, 48 and 72 h), low cell viability. In this way, turkey dewlap can be a new source of hyaluronic acid, with potential application in the medical and pharmaceutical fields, adding to the reuse and valuation of this by-product for the turkey processing industries.

Key words: By-products. Hyaluronic acid. Dermatan sulfate. Chondroitin sulfate. Anticoagulant. Antitumor.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Tipos de sulfato de condroitina.....	33
<b>Tabela 2</b> – Alguns estudos de obtenção de glicosaminoglicanos. ....	39
<b>Tabela 3</b> – Equação para construção do gráfico para viscosidade intrínseca. ....	46
<b>Tabela 4</b> Composição proximal das barbelas de peru antes da escaldagem.....	50
<b>Tabela 5</b> - Frações obtidas durante a cromatografia de troca iônica. ....	53
<b>Tabela 6</b> - RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (ppm) da fração F-V comparados com dados da literatura. ....	54
<b>Tabela 7</b> -RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (ppm) da fração F-VII. ....	59
<b>Tabela 8</b> - Atividade anticoagulante <i>in vitro</i> das frações de glicosaminoglicanos da barbelas de peru em plasma ovino. ....	63
<b>Tabela 9</b> – Inibição da atividade anticoagulante <i>in vitro</i> por protamina sulfato .....	64



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Peru macho da espécie <i>Meleagris gallopavo</i> .....	29
<b>Figura 2</b> - Glicosaminoglicanos na matriz extracelular estão ligados ao núcleo proteico formando os proteoglicanos.....	30
<b>Figura 3</b> - Estruturas dissacarídicas dos GAGs mais comuns que são encontradas em animais e exploradas por indústrias farmacêuticas em todo o mundo. ....	31
<b>Figura 4</b> - Etapas do processo de extração dos glicosaminoglicanos das barbelas de peru. ...	43
<b>Figura 5</b> - Fracionamento dos glicosaminoglicanos da barbela do peru com cromatografia de troca iônica e determinação de ácido urônico e determinação de GAGs sulfatados com reagente de DMB.....	52
<b>Figura 6</b> – Espectro de RMN-1H AH padrão (a) e F-V (b), em D <sub>2</sub> O.....	55
<b>Figura 7</b> Espectro HSQC da F-V em D <sub>2</sub> O. Espectro de <sup>13</sup> C ao lado. ....	55
<b>Figura 8</b> Espectro COSY da F-V, em D <sub>2</sub> O. (---) GlcNAc e (---) GlcA .....	56
<b>Figura 9</b> – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da FVII, em D <sub>2</sub> O. (---) IdoA, (---) GlcA, (---) GalNAc4S, (---) GalNAc6S e (---) GlcA(6S). ....	57
<b>Figura 10</b> - Espectro COSY da F-VII, em D <sub>2</sub> O. (---) IdoA, (---) GlcA, (---) GalNAc4S e (---) GlcA(6S).....	58
<b>Figura 11</b> – Espectro HSQC da F-VII, em D <sub>2</sub> O .....	58
<b>Figura 12</b> - Viscosidade reduzida versus a concentração de ácido hialurônico extraído da barbela de peru.....	60
<b>Figura 13</b> - Percentual de viabilidade de células tumorais hepáticas humanas (HepG2/C3A) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-V (µg/mL), por 24, 48 e 72 h.....	66
<b>Figura 14</b> – Percentual de viabilidade de células tumorais de rim humano (786-0) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-V (µg/mL), por 24, 48 e 72 h.....	67
<b>Figura 15</b> - Percentual de viabilidade de células tumorais hepáticas humanas (HepG2/C3A) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-VII (µg/mL). ....	68
<b>Figura 16</b> - Percentual de viabilidade de células tumorais de rim humano (786-0) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-VII (µg/mL).69	
<b>Figura 17</b> Percentual de viabilidade de células tumorais hepáticas humanas (HepG2/C3A) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações dos GAGs totais (µg/mL). ....	69
<b>Figura 18</b> – Percentual de viabilidade células tumorais de rim humano (786-0) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações dos GAGs totais (µg/mL).....	70



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AH - Ácido hialurônico  
ANOVA - Análise de variância  
aPTT- Tempo de protrombina parcial ativada  
AT - Antitrombina  
BOD – Demanda bioquímica de oxigênio  
C - Carbono  
Ca<sup>++</sup> - Cálcio  
CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de cálcio  
CH<sub>3</sub>I - Iodeto de metila  
CO<sup>-</sup> - Controle negativo  
CO<sup>+</sup> - Controle positivo  
CO<sub>2</sub>- Gás carbônico  
COSY – Espectro de correlação (*Correlation Spectroscopy*)  
CuSO<sub>4</sub> - Sulfato de cobre  
D<sub>2</sub>O - solvente deuterado  
DEAE - Dietilaminoetil  
DMB- Azul 1-9 dimetiletileno  
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
F-I – Fração I  
F-II - Fração II  
F-III - Fração III  
F-IV - Fração IV  
F-V - Fração V  
F-VI – Fração VI  
F-VII – Fração VII  
g- gramas  
GAGs - Glicosaminoglicanos  
GlcA - Ácido glucurônico  
GlcN - Glucosamina  
GlcNAc - Glucosamina acetilada  
GlcNSO<sub>3</sub> - Glucosamina sulfatada  
GS - Grau de substituição  
h – hora  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Ácido sulfúrico  
HCII - Cofator II de heparina  
HCl - Ácido clorídrico  
Hp - Heparina  
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência  
HSO<sub>3</sub>Cl - Ácido clorossulfônico  
HSQC – Espectro de infravermelho (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*)  
HepG2/C3A - célula derivadas de carcinoma hepatocelular humano  
doA - Ácido idurônico  
kDa - KiloDaltons  
Kg – Quilograma  
RMN – Ressonância magnética nuclear  
SC – Sulfato de condroitina  
SD – Sulfato de dermatana  
SH – Sulfato de heparana  
786-0 - Célula derivada de adenocarcinoma renal humano



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
3.1 PRODUÇÃO DE PERU ( <i>MELEAGRIS GALLOPAVO</i> ).....	27
3.1.1 Subprodutos do Peru .....	27
3.1.2 Barbelas de Peru ( <i>Meleagris gallopavo</i> ) .....	28
3.2 GLICOSAMINOGLICANOS .....	29
3.2.1 Ácido hialurônico .....	31
3.2.2 Sulfato de condroitina.....	33
3.2.3 Sulfato de dermatana .....	34
3.2.4 Sulfato de heparina .....	34
3.2.5 Sulfato de heparana.....	36
3.2.6 Sulfato de queratana .....	37
3.2.7 OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS.....	38
3.2.8 PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS GLICOSAMINOGLICANOS.....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.2 MATERIAL .....	42
4.2.1 Matéria prima .....	42
4.2.2 Enzimas e reagentes.....	42
4.3 MÉTODO.....	42
4.3.1 Preparo da matéria-prima .....	42
4.3.2 Composição proximal das barbelas de peru .....	42
4.4 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DAS BARBELAS DE PERU.....	42
4.4.1 Extração dos glicosaminoglicanos .....	42
4.4.2 Fracionamento dos glicosaminoglicanos por cromatografia de troca iônica (DEAE- Sepharose Fast Flow).....	Erro! Indicador não definido.
4.4.3 Determinação de glicosaminoglicanos sulfatados na presença do reagente 1-9 azul dimetilmetileno (DMB).....	44
4.4.4 Determinação de ácido urônico, com reagente de carbazol .....	44
4.4.5 Agrupamento dos glicosaminoglicanos em frações .....	45
4.4.6 Rendimento de glicosaminoglicanos .....	45
4.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) ..	45
4.6 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE INTRINSECA E MASSA MOLAR.....	46
4.7 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO POR GRUPO SULFATO (DS) 46	DS=47
4.8 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS FRAÇÕES DOS GLICOSAMINOGLICANOS DA BARBELA DE PERU .....	47
4.8.2 Inibição da atividade anticoagulante com protamina.....	48
4.8.3 Teste de citotoxicidade/atividade antiproliferativa .....	48
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BARBELAS DE PERU .....	50
5.2 EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DE GLICOSAMINOGLICANOS .....	50
5.3 FRACIONAMENTO DOS GLICOSAMINOGLICANOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	51
<b>5.3.1 Identificação de glicosaminoglicanos por ressonância magnética nuclear – RMN</b>	<b>53</b>
5.3.1.1 Caracterização dos glicosaminoglicanos da F-V .....	54
5.4 DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URÔNICO COM REAGENTE DE CARBAZOL .....	59
5.5 VISCOSIDADE INTRÍNSECA E MASSA MOLAR.....	59
5.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO POR GRUPO SULFATO (DS) 61	
5.7 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS FRAÇÕES DOS GLICOSAMINOGLICANOS DA BARBELA DE PERU .....	62
<b>5.8.1 Atividade anticoagulante <i>in vitro</i></b> .....	<b>62</b>
<b>5.8.2 Inibição da atividade anticoagulante dos glicosaminoglicanos com protamina ....</b>	<b>64</b>
<b>5.8.3 Atividade citotóxica/antiproliferativa <i>in vitro</i></b> .....	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018), o terceiro maior produtor mundial de carne de peru é o Brasil, tendo apenas os Estados Unidos e a União Europeia à sua frente (ABPA, 2018). O consumo de carne de peru ainda é reduzido nos mercados internos e externos quando comparados às carnes de frango, bovinos e suínos.

Durante o processo de industrialização de peru são gerados uma grande quantidade de subprodutos, que têm como principal destino a seção de graxaria. Uma planta industrial, que abate 68 mil toneladas de peru por ano, gera 1,4 mil toneladas de subprodutos nesse período (LIMA, 2020). Dentre estes subprodutos estão: as vísceras, pulmão, cabeça, barbela e traqueia, que são utilizados para a fabricação de ração animal com baixo retorno econômico.

As barbelas de peru são tuberosidades carnosas localizadas no pescoço dos animais com coloração que varia de vermelha à cinza, conforme o humor do animal (DYCE; SACK; WENSING, 2004). Os perus machos e fêmeas possuem barbelas, sendo mais evidentes nos machos, representando até 9 % do peso (BARATTI et al., 2010). Essas tuberosidades possuem uma grande quantidade de tecido conjuntivo, podendo ser uma fonte potencial para a extração de glicosaminoglicanos (GAGs).

Os GAGs são parte da família de polissacarídeos aniônicos, composta por unidades de dissacarídeos repetidas de hexosamina (glucosamina e galactosamina) e ácido urônico (ácido glucurônico e ácido idurônico) ou galactose (encontrada no sulfato de queratana) (SWANN, 1967). Os GAGs mais comuns são sulfato de condroitina (SC), sulfato de dermatana (SD), ácido hialurônico (AH), sulfato de queratana (SQ), sulfato de heparina (Hp) e sulfato de heparana (SH) (CASU, 1985). Estes são encontrados na superfície das células animais, no tecido conjuntivo e na matriz extracelular, e são compostos por colágeno, glicoproteína, proteoglicano e glicosaminoglicano (BOAS, 1949; PALMER, 1934). Os GAGs são conhecidos por se ligarem e regularem diferentes proteínas e podem ser obtidos de tecidos e subprodutos de animais (MACCARI et al., 2010; VOLPI, 2010).

Os GAGs possuem diferentes densidades de carga negativa em sua estrutura, resultando em propriedades estruturais e biológicas distintas (SILA et al., 2018). Podem funcionar como agentes terapêuticos em processos biológicos, apresentando efeitos como antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórios, antiproliferativos e anticoagulantes (KRICHEN et al., 2018; LIU et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2019; SILA et al., 2018). Dentre os GAGs, o

de maior valor comercial é o ácido hialurônico. Este é obtido industrialmente de corpo vítreo dos olhos de mamíferos e da crista de galo, com uso garantido nas áreas médico-farmacêutica (FALLACARA et al., 2018). O ácido hialurônico de alta massa molar ( $10^6$  Da) possui alto valor agregado (US\$ 65,00/ 100 mL) e não é produzido comercialmente no Brasil (BORSCHIVER, et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019).

Estudos explorando subprodutos da industrialização de peru, para fins mais nobres, ainda são escassos. Por ser o Brasil um dos principais produtores mundiais de peru (ABPA, 2018), há uma elevada geração de subprodutos deste processamento. Este estudo teve como objetivo investigar a presença de glicosaminoglicanos nas barbelas de peru, bem como, caracterizar os GAGs em especial o ácido hialurônico e avaliar a atividade biológica dos GAGs, com relação à capacidade anticoagulante e às propriedades antitumorais/antiproliferativa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair e caracterizar os glicosaminoglicanos da barbeta de peru (*Meleagris gallopavos*) e avaliar suas propriedades bioativas, afim de agregar valor a este subproduto.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair glicosaminoglicanos das barbetas de peru;
- ✓ Fracionar os glicosaminoglicanos e purificar por cromatografia de troca iônica;
- ✓ Identificar os glicosaminoglicanos isolados;
- ✓ Caracterizar o ácido hialurônico;
- ✓ Avaliar a bioatividade *in vitro* com relação a atividade anticoagulante e propriedades citotóxica/antiproliferativa, das frações de GAGs extraídas da barbeta do peru.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 PRODUÇÃO DE PERU (*Meleagris gallopavo*)

Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal, o Brasil produziu 390,48 milhões de toneladas de carne de peru em 2018, o que o torna o terceiro maior produtor mundial desta carne, sendo que a região sul corresponde à 82% desta produção (ABPA, 2018). A produção brasileira de carne de peru, se divide em 79% *in natura* e 21% de industrializados (LIMA, 2017). O peso médio das aves abatidas é de 12 kg (110 dias de vida) para as fêmeas e de 20 kg (140 dias de vida) para os machos. O Brasil é o único país que consome a ave natalina com um peso de 4 kg (60 dias de vida) e o peso tão baixo está relacionado com o tamanho das famílias e às questões culturais (LIMA, 2017).

O processo de abate do peru é similar ao do frango, porém, esta similaridade não é equivalente ao consumo destas carnes no mercado interno. Diferente dos países europeus, o consumo brasileiro de carne de peru per capita é de 1,7 kg/ano, a limitação de consumo se dá em razão dos brasileiros consumirem peru apenas no natal, e, também, em razão do preço. (SANTOS, 2018).

##### 3.1.1 Subprodutos do Peru

Grande parte dos resíduos da indústria de carnes que são gerados durante o abate (LIMA, 2017) consistem em subprodutos que não podem ser embalados e comercializados, tais como: papo, traqueia, esôfago, baço, barbela, órgãos reprodutores, e pulmões.

A retirada de rins, pés, coração, pescoço e cabeça durante o abate é facultativa, porém, quando os pés e pescoço (com ou sem cabeça) são retirados na linha de abate, para fins comestíveis, estes deverão ser imediatamente resfriados, e obrigatoriamente devem ser embalados de forma individual (BRASIL, 1998).

Estima-se que aproximadamente 20 a 30 % da produção mundial de aves sejam consideradas subprodutos (LIMA, 2020). Comumente esses resíduos são de baixo valor agregado e na maioria das vezes são aproveitados na seção de graxaria, para a produção de farinhas e óleos utilizados na fabricação de ração animal (BARATTI et al., 2010).

À medida que aumenta a produção brasileira de carne de peru, cresce, também, a geração destes subprodutos durante o abate (SANTOS, 2020). Embora não sejam consumidas por seres humanos, a carne mecanicamente separada (CMS), tais como: cartilagens, tendões e ossos, têm potencial para serem utilizados em ingredientes alimentares, incluindo a obtenção

de peptídeos bioativos (KHIARI; NDAGIJIMANA; BETTI, 2014), gelatinas (DU et al., 2014) e colágeno (GRØNLIEN et al., 2019). As cristas e barbelas de aves são uma fonte apropriada para a produção de GAGs como o ácido hialurônico e o sulfato de condroitina (NAKANO; BETTI; PIETRASIK, 2010).

As cabeças de peru e de frango (DU et al., 2013) e a carne mecanicamente separada de peru (DU et al., 2014) foram estudadas para a extração de gelatina. Os resultados das análises reológicas destas pesquisas foram comparados com as gelatinas de frango e de mamíferos e demonstraram potencial para aplicação em alimentos e fármacos, podendo ser um possível substituto das gelatinas convencionais.

Os tendões de peru foram utilizados para extração de colágeno por Grønlien et al., (2019). Após obter resultados positivos nas análises físico-químicas, desenvolveram *scaffolds* do colágeno de peru. A viabilidade celular foi avaliada e os resultados apresentaram biocompatibilidade, denotando a capacidade dos *scaffolds* de colágeno de peru para utilização no transporte de medicamentos.

Peptídeos bioativos foram extraídos da cabeça de peru no estudo de Khiari; Ndagijimana; Betti, (2014) e apresentaram atividades hipocolesterolêmica e anti-inflamatórias, com potencial para produção de ingredientes de alimentos funcionais.

Apesar da similaridade entre as aves, frango e peru, estudos avaliando o potencial para utilização de subprodutos do abate de peru ainda são escassos em comparação com as pesquisas explorando subprodutos de outras aves. Os subprodutos de peru possuem potencial a serem explorados para futuras aplicações nas áreas alimentícias, farmacológicas e na cosmetologia.

### **3.1.2 Barbelas de Peru (*Meleagris gallopavo*)**

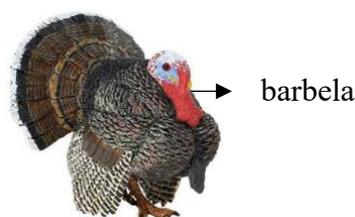
A barbela está localizada no pescoço de perus de ambos os sexos, sendo mais evidente em perus machos, com coloração que varia de vermelha a cinza (Figura 1). A mudança de cor da barbela ocorre em resposta aos hormônios masculinos que mudam temporariamente a depender da alteração de humor do animal, animação, medo, raiva ou alerta. (BARATTI et al., 2010). A barbela também é responsável pelas propriedades termorreguladoras, auxiliando na homeostase dos animais (BUCHHOLZ, 1996).

A barbela de peru na maioria das vezes é descartada junto com a cabeça, (BARATTI et al., 2010). A utilização das barbelas como fonte de matéria-prima para extração de ingredientes que agreguem valor comercial é mais atrativa do que a sua comercialização *in*

*natura*. Estima-se que 9 % dos subprodutos do peru, são barbelas, e estas podem ser consideradas uma fonte potencial para a extração de GAGs, pois são constituídas por grande quantidade de tecido conjuntivo.

Estruturalmente a barbela de peru é muito similar à crista do galo, que é a principal fonte de obtenção de ácido hialurônico, um dos GAGs de grande interesse farmacológico, devido ao seu alto grau de pureza.

**Figura 1** – Peru macho da espécie *Meleagris gallopavo*



Fonte: LIMA (2017).

### 3.2 GLICOSAMINOGLICANOS

O espaço extracelular é preenchido por componentes fibroconjuntivos denominados de matriz extracelular. A matriz extracelular é constituída, em proporções variáveis, por colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, GAGs e elementos celulares (NELSON; COX, 2014).

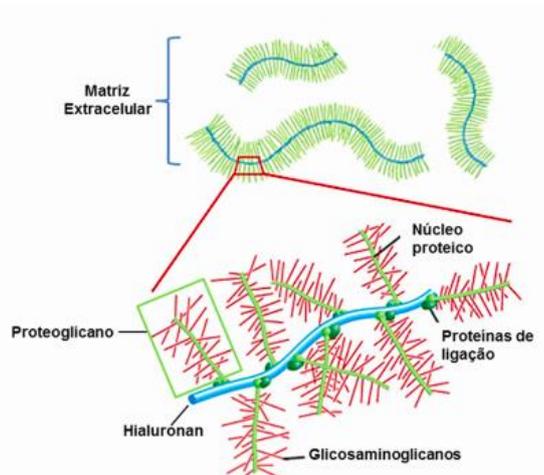
Os GAGs são heteropolissacarídeos que têm como estrutura básica unidades alternadas de hexosamina e açúcar não-nitrogenado unidas por ligações glicosídicas. Estas são cadeias polissacarídicas não-ramificadas, compostas de unidades repetidas de dissacarídeos. São chamados GAGs porque um dos dois açúcares do dissacarídeo repetido sempre é um açúcar aminado (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) e normalmente sulfatado. O segundo açúcar, normalmente, é um ácido urônico (glicurônico ou idurônico) (BOAS, 1949).

Devido à presença de grupos sulfato e carboxila, os GAGs são carregados negativamente e estão divididos em quatro grupos principais de acordo com a molécula de açúcar e o tipo de ligação, sendo estes: sulfato de condroitina, sulfato de queratana, sulfato de dermatana, sulfato de heparana, sulfato de heparina e o ácido hialurônico (BOAS, 1949; RANI; BARUAH; GOYAL, 2017).

Os GAGs sulfatados são ausentes nos reinos plantae, fungi e protista, mas são presentes no reino animal, em todas as espécies que apresentam organização tecidual. Podem

ser obtidos da matriz extracelular, por meio de hidrólise enzimática ou química. (ALBERTS et al., 2010). Na Figura 2, está apresentado a organização dos GAGs na matriz extracelular.

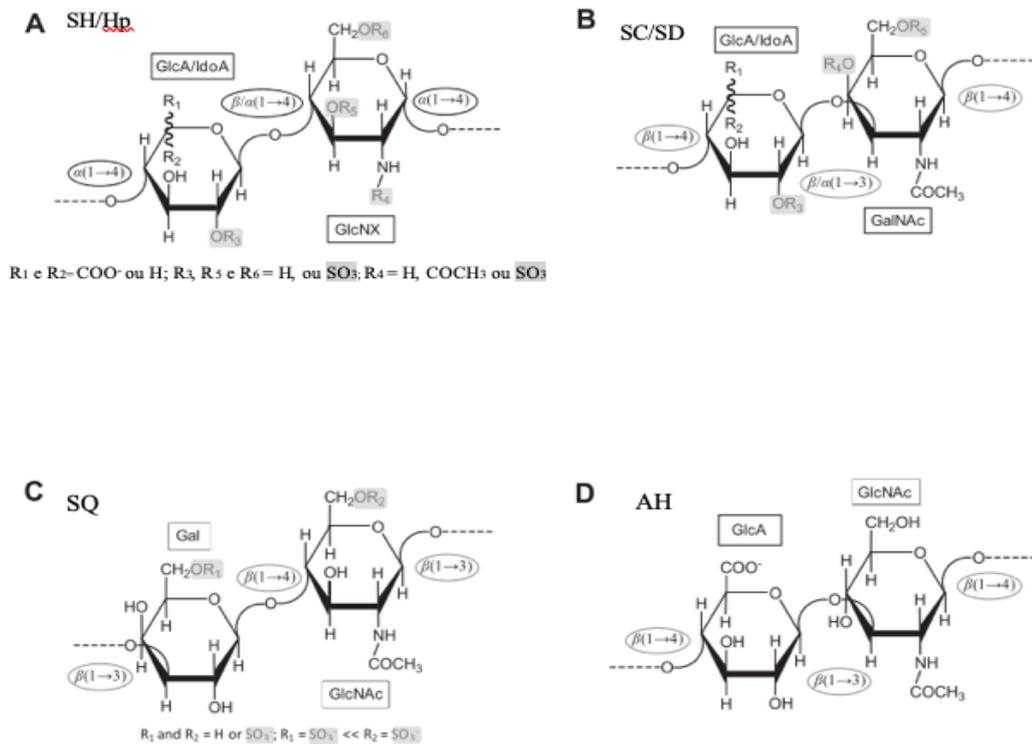
**Figura 2** - Glicosaminoglicanos na matriz extracelular estão ligados ao núcleo proteico formando os proteoglicanos.



Fonte: ALBERTS et al., (2010).

Na Figura 3 está apresentado as estruturas dos GAGs mais comuns. Pode-se observar que as ligações glicosídicas são indicadas por elipses, enquanto que os tipos de monossacarídeos são indicados por retângulos pretos. Para uma notação rápida dos padrões de sulfatação, os locais de sulfatação são destacados por retângulos cinza claro. Sulfato de heparana (SH) e sulfato de heparina (Hp) (Figura 3A) ambos são compostos por unidades alternadas de ácido urônico de 4 ligações e  $\alpha$ -D-glucosamina 4 (GlcN). O SH possui o ácido  $\beta$ -D-glucurônico (GlcA) como principal tipo de ácido urônico, enquanto que o Hp possui o ácido  $\alpha$ -L-idurônico (IdoA). O Hp é predominantemente composto por 2 IdoA sulfatado junto com N, unidades GlcN dissulfatadas 6. A sulfatação 3-O de unidades GlcN ocorre mais frequentemente em Hp do que em SH. Sulfato de condroitina (SC) e sulfato de dermatana (SD) (Figura 3B), SC é composto por unidades alternadas de  $\beta$ -D-GlcA e  $\alpha$ -D-galactosamina (GalNAc) e SD tem unidades  $\alpha$ -L-IdoA em vez de  $\beta$ -GlcA, como em SC. As unidades IdoA em SD podem conter 2-sulfatação, enquanto que as unidades GalNAc são, principalmente, 4-sulfatadas. Sulfato de queratana (SQ), composto por unidades de 3-galactose (Gal) e  $\alpha$ -D-GlcNAc. SQ pode resistir à sulfatação na posição 6 de cada unidade, embora a sulfatação em GlcNAc ocorra com mais frequência (Figura 3C). Ácido hialurônico (AH), um polímero não sulfatado de unidades ligadas a 4-D-GlcA e 3- $\beta$ -D-GlcNAc ligadas (Figura 3D).

**Figura 3** - Estruturas dissacarídicas dos GAGs mais comuns que são encontradas em animais e exploradas por indústrias farmacêuticas em todo o mundo.



Fonte: (POMIN, 2015a)

Os GAGs mais abundantes são o sulfato de heparana e sulfato de condroitina, seguidos de sulfato de heparina e sulfato de dermatana (RANI; BARUAH; GOYAL, 2017). Os mais valorizados no mercado são o sulfato de condroitina, devido à sua abundância em tecidos de mamíferos, e o ácido hialurônico, por suas funções fisiológicas e versatilidade, ambos com alta atividade (SAFDAR et al., 2017). Os GAGs têm sido amplamente aplicados nas áreas clínicas (CHEN et al., 2018; MAHMOUD et al., 2018) e da saúde (BOUGATEF et al., 2018; HUSSAIN et al., 2017).

### 3.2.1 Ácido hialurônico

Em 1934, Karl Meyer e John Palmer descreveram um polissacarídeo composto de ácido urônico e hexosamina, obtido do corpo vítreo do olho bovino. Os autores propuseram o nome de ácido hialurônico, do grego hialóide (vítreo) e ácido urônico (PALMER, 1934).

Entre os GAGs, o ácido hialurônico (AH) tem uma das estruturas menos

complexas. É um polissacarídeo aniônico, solúvel em água, composto por unidades de dissacarídeo repetidas contendo N-acetilglucosamina, ácido  $\beta$ -D-glucurônico, ligados por meio de ligações glicosídicas alternadas  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  4) e  $\beta$ - (1  $\rightarrow$  3) (SAFDAR et al., 2017). O AH pode conter 30.000 unidades repetidas de dissacarídeo e tem uma alta massa molar ( $10^5$ – $10^7$  Da) (MAHMOUD et al., 2018).

O AH possui consistência gelatinosa, alta viscoelasticidade e alto grau de hidratação, devido às características estruturais da molécula (ALVES et al., 2017). Estudos de espalhamento de luz mostram que AH é uma esfera curva com pouca polidispersidade e rigidez (NAKANO; SIM, 1991).

Pode ser encontrado em tecidos conjuntivos de animais, como pele e cartilagem, preenchendo os espaços intercelulares, principalmente mantendo a flexibilidade e estrutura dos tecidos (HUSSAIN et al., 2017). Altas concentrações de AH podem ser encontradas em alguns órgãos, como cordão umbilical, líquido sinovial e corpo vítreo; no entanto, o maior conteúdo é encontrado na crista do galo, apresentando cerca de 7,5 mg (ALVES et al., 2017).

Alguns estudos observaram que a quantidade de AH presente na crista de galo pode ser variável e está relacionada com a idade dos animais. O AH foi obtido em quantidades superiores (42 mg) na crista de galos em animais de 364 dias (NAKANO; SIM, 1988). De acordo com Nakamo e Sim (1991), outro fato que pode afetar a qualidade do AH é a etapa de escaldagem, pois esta pode reduzir a concentração de AH. Rosa et al., (2008) estudou a presença de AH em uma mistura de crista de frangos machos e fêmeas de 45 dias e o AH encontrado foi em menor quantidade 14,9  $\mu$ g/mg de tecido.

Há uma crescente demanda global por AH de alta massa molar para fins médicos (SADHASIVAM et al., 2013a). O grau de pureza, a qualidade e a elasticidade são fatores que estão inteiramente relacionados à massa molar, quanto maior, mais puro é o AH e maior é o seu valor comercial (BORSCHIVER et al., 2018).

O AH de alto valor agregado é amplamente aplicado para vários usos medicinais, nas áreas de implante ósseo, no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos, na engenharia de tecido, em cirurgias oftalmológicas, na reposição de líquido sinovial e na liberação de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos (ABDALLAH et al., 2020). No entanto, o AH de baixa massa molar também é amplamente utilizado em diversos tratamentos na área cosmética e para encapsulação e liberação controlada de fármacos (NAKANO; OZIMEK; BETTI, 2012; TAVIANATOU et al., 2019).

Nas áreas farmacêutica, médica e cosmética, o AH é utilizado para a produção de hidrogéis, *scaffolds*, filmes, cremes, espumas e géis (AMADO et al., 2016). Alguns estudos

têm mostrado que o AH tem amplas aplicações farmacológicas, tais como antidiabéticos (WANG; BETTI, 2017), antienvhecimento e reparação de pele (PAPAKONSTANTINO; ROTH; KARAKIULAKIS, 2012), antiproliferativo (SADHASIVAM et al., 2013a), anti-inflamatório (LI HUI CHEN et al., 2018) e para cicatrização e reparo de tecidos (ALVES et al., 2017).

O AH presente em tecidos animais é complexado com proteoglicanos, o que dificulta a obtenção de AH com alto grau de pureza (KUBASKI et al., 2017). Atualmente, os estudos estão focados na melhoria da qualidade e na redução do tempo de extração com melhor rendimento, além de descobrir novas fontes para a obtenção de AH.

### 3.2.2 Sulfato de condroitina

O sulfato de condroitina (SC) é uma classe de polissacarídeos lineares longos, compostos de unidades de sacarídeo alternadas de  $\alpha$ -D-galactosamina (GalNAc) e ácido glucurônico (GlcA) (TÓTH et al., 2020). Os resíduos GalNAc podem ser sulfatados nas posições 4 e / ou 6, enquanto o ácido  $\beta$ -D-glucurônico (GlcA) pode ser sulfatado na posição 2 (SOLAKYILDIRIM, 2019). Na Tabela 1 está apresentado a divisão do SC, de acordo com diferentes padrões de sulfatação (ZHANG, 2010; MENDE et al., 2016; ZHOU et al., 2018).

**Tabela 1** – Tipos de sulfato de condroitina

Tipos de SC	Maior dissacarídeo	Outros dissacarídeos
SC-A	GlcA–GalNAc (4S)	GlcA–GalNAc/GlcA (2S)–GalNAc
SC -C	GlcA–GalNAc (6S)	IdoA–GalNAc (4S, 6S)/GlcA (3S)–GalNAc (4S)
SC -D	GlcA (2S)–GalNAc (6S)	IdoA (2S)–GalNAc (4S, 6S)/GlcA (3S)–GalNAc (4S, 6S)
SC -E	GlcA–GalNAc (4S, 6S)	IdoA (2S)–GalNAc/GlcA (3S)–GalNAc (6S)

Fonte: Adaptado de Zhang et al., (2010).

O SC é amplamente encontrado na superfície celular e na matriz extracelular na forma de proteoglicanos. Altas concentrações de SC são encontradas em tecidos cartilagosos, dentro de uma fina camada de colágeno, com uma substância amorfa contendo glicoproteínas, AH e proteoglicanos (SILA et al., 2018). Atualmente, as principais fontes de produção de SC são os tecidos cartilagosos de bovinos, suínos e aves (SHI, et al., 2014).

O SC abrange uma ampla gama de aplicações em diversos setores, como farmacêutico, cosmético e alimentício. É usado no tratamento da osteoartrite (LIU et al., 2018a), em medicina regenerativa (PLACE; EVANS; STEVENS, 2009) e como suplemento dietético para a prevenção e tratamento de problemas de articulação (WANG; DI; WU, 2018), entre outros.

### **3.2.3 Sulfato de dermatana**

O sulfato de dermatana (SD) é formado pela repetição de unidades de dissacarídeo de  $\alpha$ -D-galactosamina (GalNAc) e ácido L-idurônico (L-IdoA) (KARIMZADEH, 2018). O SD tem grupos sulfato mais comumente encontrados na posição 4 dos resíduos de GalNAc e, ocasionalmente, na posição 6 de GalNAc e na posição 2 dos resíduos de ácido L-IdoA (LINHARDT; HILEMAN, 1995).

O SD tem uma estrutura híbrida devido à modificação do resíduo ácido  $\beta$ -D-glucurônico (GlcA), envolvendo epimerização de C-5 para formar L-IdoA (VOLPI; MACCARI; TITZE, 2005). Tal como o SC, o SD é estruturalmente baseado em GalNAc como o componente de açúcar. O SC-B é um nome antigo para SD e não é mais classificado como uma forma de SC (MENDE et al., 2016).

O SD está amplamente disseminado no tecido de mamíferos, e é encontrado principalmente em tecidos conjuntivos densos, tais como tendão e pele (KARIMZADEH, 2018). O SD organiza e mantém as fibrilas de colágeno e sua velocidade de deposição (KRICHEN et al., 2017a), além de desempenhar um papel importante em um conjunto diversificado de processos biológicos, incluindo na proliferação e na diferenciação celular, na cicatrização de feridas e em atividades anticoagulantes, antitrombóticas e anti-inflamatórias (LINHARDT; HILEMAN, 1995). Ademais, o SD inibe a formação de coágulos associada à trombina, agindo de forma não sistêmica, com menos efeitos colaterais, enquanto inibe seletivamente a ação da trombina pelo cofator II da heparina (HCII) com efeito profibrinolítico (HIGASHI et al., 2015). Uma de suas aplicações mais recentes é em dispositivos médicos e na preparação de tecidos artificiais (HIGASHI et al., 2015).

### **3.2.4 Sulfato de heparina**

O sulfato de heparina ou heparina (Hp) foi descoberta em 1916 por Jay McLean,

um estudante de medicina, e William Henry Howell, um professor. O termo heparina provém do do grego "hepar", que significa fígado de onde a substância foi isolada. A heparina foi testada pela primeira vez em humanos, em 1937, como um anticoagulante, mas não se sabe exatamente como o efeito anticoagulante foi atribuído (XU; ARNOLD; LIU, 2018). Em 1968, Abildgaard confirmou esses dados após isolar a antitrombina pela primeira vez (VISKOV et al., 2013).

A Hp é um anticoagulante natural e antitrombótico que bloqueia a formação de tromboplastina, um fator de coagulação do sangue (TSAI; ZULUETA; HUNG, 2017). A coagulação é um mecanismo de defesa do organismo que atua na prevenção de sangramentos, envolvendo uma série de etapas que culminam na formação de um coágulo. (DAHLBACK, 2000; WERNECK et al., 2000).

Encontrada em tecidos de vertebrados e invertebrados, especialmente no intestino e nas membranas mucosas. Apesar de sua alta atividade anticoagulante quando usado como medicamento, não é endogenamente encontrada na corrente sanguínea, e sua atividade biológica ainda é desconhecida (KACZMAREK et al., 2017). A Hp está essencialmente confinada aos mastócitos do tipo tecido conjuntivo e é liberado na matriz extracelular livre de qualquer proteína central (LINDAHL; KJELLÉN, 1991; BONNAFFÉ, 2011).

A Hp é um GAG constituído principalmente por unidades de GlcA (N-acetilada ou N-sulfatada) e ácido urônico (idurônico ou glucurônico), unidos por ligações glicosídicas 1-4, apresentando um padrão complexo de substituição por grupos sulfato (RANI; BARUAH; GOYAL, 2017).

Na Hp, geralmente, há uma alta proporção de resíduos de glucosaminil (acima de 80%) e grande proporção de IdoA (XU; JIN, 2020). A massa molar da Hp varia de 5 a 40 kDa, com média de 18 kDa (BONNAFFÉ, 2011; RANI; BARUAH; GOYAL, 2017). Sendo a macromolécula biológica com carga negativa mais conhecida (XU; JIN, 2020).

A ativação de uma cascata de coagulação sanguínea resulta na produção de trombina e formação de coágulos com sua subsequente dissolução. A Hp atua por meio da ativação da antitrombina III, um inibidor da serina protease, que inibe a atividade das enzimas da cascata de coagulação do sangue fator Xa e fator IIa (BONNAFFÉ, 2011; LORI-ANN; WARKENTIN, 2011; TSAI; ZULUETA; HUNG, 2017). Esta ação catalítica da Hp é atribuída à sua capacidade de se ligar a sítios básicos por meio de seus grupos sulfato e carboxila carregados negativamente (CIPRIANI et al., 2009).

Quando ligada, a Hp provoca alterações na conformação da antitrombina, tornando seu sítio reativo mais acessível, favorecendo a ligação da trombina ou do fator Xa,

respectivamente. A Hp, a serina protease e a serpina se unem para formar um complexo ternário, que é capaz de aumentar a velocidade da reação de inibição da trombina pela antitrombina em até 1000 vezes, após o qual a Hp é liberada (BONNAFFÉ, 2011; TSAI; ZULUETA; HUNG, 2017).

### **3.2.5 Sulfato de heparana**

O sulfato de heparana (SH) foi identificado pela primeira vez em preparações comerciais de Hp como um subproduto da heparina de baixa sulfatação. No entanto, o SH, ao contrário da Hp, está presente em todos os tecidos com diferentes tipos de proteoglicanos e é encontrado na superfície das células de mamíferos e na matriz extracelular (KRICHEN et al., 2018b). O SH é o mais onipresente e diversificado entre os membros da família dos GAGs (ZULUETA; CHYAN; HUNG, 2018; GULBERTI et al., 2020).

A massa molar do SH varia de 5 a 50 kDa (LINHARDT; HILEMAN, 1995; LIU et al., 2018a). Existem 48 unidades de dissacarídeo possíveis que podem formar uma cadeia completa de SH com 10-100 unidades de dissacarídeo (XU; ARNOLD; LIU, 2018). A depender do tipo de célula, podem ocorrer variações no grau de sulfatação e acetilação e na proporção dessas unidades (DIETRICH; MCDUFFIE; SAMPAIO, 1977).

Geralmente está associado a um esqueleto de proteína formando proteoglicanos, presentes na superfície celular, na matriz extracelular ou em grânulos intracelulares conforme citado. Os proteoglicanos SH participam de mecanismos biológicos especializados para o reconhecimento e sinalização celular (DIETRICH; MCDUFFIE; SAMPAIO., 1977; PASQUALE; PAVONE, 2019).

A compreensão da atividade biológica do SH é essencialmente baseada na diversidade estrutural de suas cadeias. Desta forma, a determinação da sequência das unidades dissacarídicas de SH em tecidos embrionários, adultos, normais e neoplásicos de diferentes patologias, bem como em células normais e em células mantidas em cultura, fornece informações sobre a atividade biológica desses compostos (DIETRICH; MCDUFFIE; SAMPAIO., 1977).

A estrutura do SH é composta por resíduos alternados de ácido hexurônico (D-GlcA ou L-IdoA) e D-glucosamina, que podem ser N-sulfatados ou N-acetilados (NAc) (HIGASHI et al., 2015). O SH é um polissacarídeo linear sulfatado e um biopolímero que consiste em unidades de dissacarídeo de repetição sulfatadas (KNELSON; NEE; BLOBE,

2014; XU; JIN, 2020). O SH geralmente tem ao menos um grupo sulfato por unidade de dissacarídeo, que pode ocorrer na forma de um O-sulfato na posição C-2 de IdoA, na forma de N-sulfato na posição C-2 e de O-sulfato na posição C-6 de resíduos de glucosamina (MOURA et al., 2020).

O SH é um tipo de GAG que está crucialmente envolvido em vários processos biológicos, tais como regulação da anticoagulação, inflamação, angiogênese, câncer, reconhecimento celular, adesão celular, reparo de tecidos e controle de crescimento celular (TSAI; ZULUETA; HUNG, 2017; GULBERTI et al., 2020). O SH promove a regulação da interação entre as células e seus arredores. Várias interações são importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções celulares (SAFDAR et al., 2017).

### 3.2.6 Sulfato de queratana

Suzuki foi o primeiro a descrever o sulfato de queratana (SQ) e o identificou como um material do tipo mucoide, contendo galactose e glicose, além de grupos acetil e sulfato (SUZUKI, 1939). O SQ é composto por unidades de dissacarídeo repetidos, galactose (Gal) e GlcNAc, com ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4, com sulfatação ocorrendo nos C6 de ambas as unidades de sacarídeo (MEYER et al., 1953).

O SQ é o único tipo de GAG sem ácido urônico e, em geral, seu grau de sulfatação varia nos diferentes tecidos (LI et al., 2018). A massa molar do SQ pode variar de 6 kDa a mais de 50 kDa a depender do tecido do qual é extraído (POMIN, 2015). As cadeias SQ são tipicamente ligadas a um núcleo de proteína, formando proteoglicanos (KRICHEN et al., 2018a).

O SQ é amplamente distribuído em tecidos de animais (CATERSON; MELROSE, 2018). O SQ presente nos ossos serve como um componente estrutural dotado de propriedades de ligação celular (SOMMARIN et al., 1998). Grandes quantidades de SQ são também encontradas na matriz extracelular da córnea e do cérebro (AMADO et al., 2017).

Estudos relataram propriedades anti-adesivas do SQ que atuam como uma barreira para o crescimento de neurites e padrões de crescimento direto dos axônios durante o desenvolvimento e regeneração (OLSON et al., 1992). O SQ pode ser usado para tratar doença pulmonar obstrutiva crônica (GAO et al., 2016) e no tratamento da inflamação das vias aéreas por infecções bacterianas (SHIRATO et al., 2013), suas propriedades terapêuticas ainda não foram completamente exploradas, ao contrário de outros GAGs sulfatados (RESTAINO et al., 2016).

### 3.2.7 Obtenção de glicosaminoglicanos

Os GAGs podem ser obtidos de variadas fontes (Tabela 2) e o seu processo de extração é longo, de custo elevado e baixo rendimento. As etapas de extração são iniciadas com a deslipidação (retirada de lipídeos) com clorofórmio e acetona, para retirada dos lipídeos aderido ao material, seguida da secagem e digestão (CARDOSO et al., 1992). A digestão proteolítica é uma das etapas mais importantes, com duração de 1 ou 2 dias, podendo ser um processo somente químico ou quimicoenzimático (NAKANO; SIM, 1991). Segundo Boas (1949), o uso de álcool amílico e clorofórmio auxilia na remoção da proteína, no entanto, para Volpi (1994), o processo livre de enzimas é ineficiente e afeta o rendimento dos GAGs. Segundo Rosa et al., (2008), a extração desses tecidos depende principalmente da eliminação da maior parte da proteína por digestão com proteases específicas, sendo que a maior vantagem do uso de enzimas sobre outros métodos é a precipitação de todos os mucopolissacarídeos, conseguindo-se uma boa purificação.

Na Tabela 2 está apresentado os estudos com as mais variadas fontes de GAGs, as enzimas utilizadas na extração, os solventes de precipitação e os rendimentos obtidos em cada estudo. Estudos mostram que o uso de enzimas na extração dos GAGs melhoram a qualidade do material extraído (NAKANO; SIM, 1991; ROSA et al., 2008).

Após a digestão, ocorre a etapa de purificação ou precipitação, esses procedimentos permitem a recuperação quantitativa de polissacarídeos que não são degradados quimicamente e podem ser precipitados com cloreto de cetilpiridínio (CPC), etanol, propanol ou metanol, com tempo médio de 48 h (VOLPI; MACCARI, 2003).

Os solventes orgânicos têm diferentes capacidades de precipitar GAGs. Segundo Volpi (1996), a precipitação está relacionada ao percentual e tipo de solvente aplicado e pode influenciar outros fatores como a massa molar, a densidade de carga e a estrutura e, por isso, o uso de solventes orgânicos é mais adequado para a precipitação de GAGs sulfatados.

O uso de um detergente catiônico para precipitação, como o CPC, auxilia a eliminação de vários contaminantes, como os ácidos nucléicos, o que não é favorável quando o AH se destina a aplicações médicas, pois pode interferir na qualidade do material extraído (CARDOSO et al., 1992).

**Tabela 2** – Alguns estudos de obtenção de glicosaminoglicanos.

<b>Fonte</b>	<b>Solvente/ enzima</b>	<b>Rendimento (extrato seco)</b>	<b>Precipitação</b>	<b>GAGs</b>	<b>Referências</b>
<b>Crista de galo</b>	Clorofórmio	0,6%	Etanol	AH	Meyer & Palmer (1934)
<b>Molusco</b>	Papaína	0,6%	Etanol	AH	Volpi & Maccari (2003)
<b>Crista de galo</b>	Papaína	2%	CPC	AH	Rosa et al. (2008)
<b>Molusco bivalve</b>	Papaina	0,8%	Etanol	AH	Sadhasivam et al. (2013)
<b>Molusco bivalve</b>	Papaína	4.2%	Etanol	AH	Kanchana et al. (2013)
<b>Pele de peixe Lumpsucker</b>	Alcalase	3%*	Metanol	SC, SD, AH	Panagos et al. (2014)
<b>Caramujo gigante</b>	Papaína	1%	Etanol	SD, SH, Hp	Liu et al. (2018)
<b>Enguia europeia</b>	Alcalase	1,22%	Etanol	SD, SH, SC	Sila et al. (2018)
<b>Pele de tilapia do nilo e pacu</b>	Alcalase	0,15% 0,18%	Etanol	SD, SH, SC	Nogueira et al. (2019)
<b>Pele de peixe porco cinza e cação liso</b>	Alcalase	8,6% 9,3%	CPC	SD, SC	Krichen et al. (2017)

\*CPC: cloreto de cetilpiridínio; AH: ácido hialurônico; SC, sulfato de condroitina; SD, sulfato de dermatan; SH, sulfato de heparano; Hp, heparina

\*\* Extrato úmido

O CPC é sugerido para a precipitação do AH, já que se trata de um composto com carga negativa e altamente hidrofílico que, na forma de ácido, precipita-se com o CPC, formando um sal. O AH precipitado com CPC origina soluções perfeitamente límpidas, diferentes das soluções tratadas com outros solventes como o etanol que produzem soluções opalescentes (SWANN, 1967).

Após o estágio de precipitação dos GAGs, o material é separado por centrifugação, filtração, seguido de congelamento e liofilização (NAKANO; BETTI; PIETRASIK, 2010). A separação e purificação de GAGs pode ocorrer por métodos de cromatografia de troca iônica (WERNECK et al., 2000), cromatografia líquida de proteína rápida (*fast protein liquid chromatography*-FPLC) (ROSA et al., 2008), cromatografia líquida de baixa pressão (*low-pressure liquid chromatography*-LPLC) (BOUGATEF et al., 2020) e

cromatografia de permeação em gel de alto desempenho (*high-performance gel permeation chromatography*-HPGPC) (LIU et al., 2018a).

### **3.2.8 Propriedades bioativas dos glicosaminoglicanos**

Os GAGs têm atividade biológica notável como co-receptores para uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (LIU et al., 2018a). Seus efeitos farmacológicos estão relacionados à massa molar e à algumas características estruturais como presença e posicionamento de grupos sulfato, os quais favorecem as interações com proteínas catiônicas e garantem a atividade biológica (AMADO et al., 2016).

A atividade anticoagulante está entre as propriedades mais estudadas dos GAGs (BOUGATEF et al., 2019; KRICHEN et al., 2018b; SILA et al., 2018). Este efeito está relacionado ao grau de sulfatação, à sua distribuição ao longo da cadeia polissacarídica e à massa molar, o que fornece a todos os GAGs sulfatados um percentual de atividade anticoagulante (LIU et al., 2018b).

O GAG mais amplamente aplicado e comercialmente conhecido por sua eficácia e potencial anticoagulante é a Hp (heparina) (BARDDAL et al., 2015). A Hp também é conhecida por seu efeito antitrombótico (BARDDAL et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2019), uma ligação de antitrombina ocorre com o cofator de heparina HCII, que forma complexos com enzimas de coagulação do sangue (LIU et al., 2018a).

O SC (sulfato de condroitina) é um dos constituintes mais importantes dos ossos, devido ao seu papel essencial na cartilagem e outros tecidos conjuntivos, além disso, é um polissacarídeo altamente heterogêneo, em termos de massa molar e grau de sulfatação, resultando em diversas atividades biológicas (KRICHEN et al., 2017b).

O SC participa de várias atividades fisiológicas dos organismos, atuando na condrogênese, na diferenciação e no crescimento celular (VALCARCEL et al., 2017) e na migração de células tumorais (LIU; LIU; WANG, 2016). Além dessas ações, o SC também pode desempenhar papéis importantes na regulação da função articular, na eliminação de radicais livres e na atividade anticoagulante (EGEA et al., 2010; VOLPI; MACCARI; TITZE, 2005; ZOU et al., 2020). É usado como um componente de medicamentos terapêuticos e, como alternativa, em casos de artrite, dores nas articulações e, às vezes, até osteoporose (GAVVA et al., 2020).

As cargas negativas, a heterogeneidade da natureza dos dissacarídeos e o número de unidades dissacarídicas do SD (sulfato de dermatana) são os principais fatores que

influenciam sua atividade biológica e farmacológica. O SD possui importante atividade farmacológica no que diz respeito, à ação antioxidante e neuroprotetora (KRICHEN et al., 2017a; RANI; BARUAH; GOYAL, 2017), à atividade antiviral, antiproliferativa e antitumoral (VOLPI, 2010; BOUGATEF et al., 2020).

O SQ (sulfato de queratana) é um dos GAGs menos explorados e na maioria dos estudos é encontrado misturado com SC (POMIN, 2015a). O SQ pode ser utilizado como ingrediente ativo em colírios para tratamentos que visam a recuperação da condição saudável desse tecido em certas desordens visuais, uma vez que o SQ é um dos principais componentes funcionais da córnea (CATERSON; MELROSE, 2018).

As propriedades físico-químicas do AH (ácido hialurônico) e sua capacidade de formar géis em soluções, permite que este seja usado como veículo para a produção de meios específicos ou soros biologicamente ativos (GRAÇA et al., 2020). A sua massa molar é considerada a propriedade mais importante em aplicações médicas que envolvem principalmente implantes ósseos (BORSCHIVER et al., 2018). A massa molar também é responsável para definir a aplicação do AH sendo os mais puros utilizados para aplicações farmacológicas (KHANMOHAMMADI et al., 2014; TAVIANATOU et al., 2019).

Entre os GAGs, o AH é o de maior versatilidade e propriedades medicinais, podendo ser aplicado em diversas áreas. Na área cosmética ele é utilizado em tratamentos como meio hidratante (SCHANTÉ et al., 2011), é, também, utilizado como meio de encapsulação para a liberação controlada de fármacos e cosméticos, (FAURE et al., 2013), anti-inflamatório (TEXIDÓ et al., 2017), substituinte do líquido sinovial em articulações ósseas (HEMSHEKHAR et al., 2016), liberação de quimioterápicos em implantes cirúrgicos (ORYAN et al., 2018), inibição de tirosinase e, também, possui potencial para regeneração da pele (LEE et al., 2017).

Todos os GAGs apresentam atividade antiproliferativas e citotóxica na linhagem de células cancerosas *in vitro* (SADHASIVAM et al., 2013b; SAYARI et al., 2016a), como atividade inibitória em tumores que crescem em camundongos (JIAO et al., 2009). Os polissacarídeos induziram apoptose em várias linhagens de células cancerígenas e estimularam as células do sistema imunológico a induzir a morte de células tumorais (AISA et al., 2005; MARUYAMA et al., 2003).

As propriedades farmacológicas, tornam os GAGs importantes agentes terapêuticos e têm se destacado como compostos antitumorais naturais, já que a maioria dos medicamentos utilizados na quimioterapia são altamente tóxicos (AISA et al., 2005).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2 MATERIAL**

#### **4.2.1 Matéria prima**

A matéria-prima utilizada foi a barbeta de peru macho (*Meleagris gallopavo*) com 145 dias de idade e peso médio de 20 kg, coletada antes da etapa de escaldagem. A matéria-prima foi cedida por uma empresa de abate de perus, localizada no oeste do Paraná, coletado em julho de 2018 e mantida congelada (-18 °C) até o momento de uso.

#### **4.2.2 Enzimas e reagentes**

A enzima utilizada para a extração foi a papaína bruta (marca: Sigma-Aldrich) e os reagentes utilizados eram todos de grau analítico.

### **4.3 MÉTODO**

#### **4.3.1 Preparo da matéria-prima**

As amostras (1,5 kg) foram descongeladas sob refrigeração 4 °C por 6 h e, então, foram cortadas na dimensão de 4 x 4 cm, para a realização das análises subsequentes.

#### **4.3.2 Composição proximal das barbelas de peru**

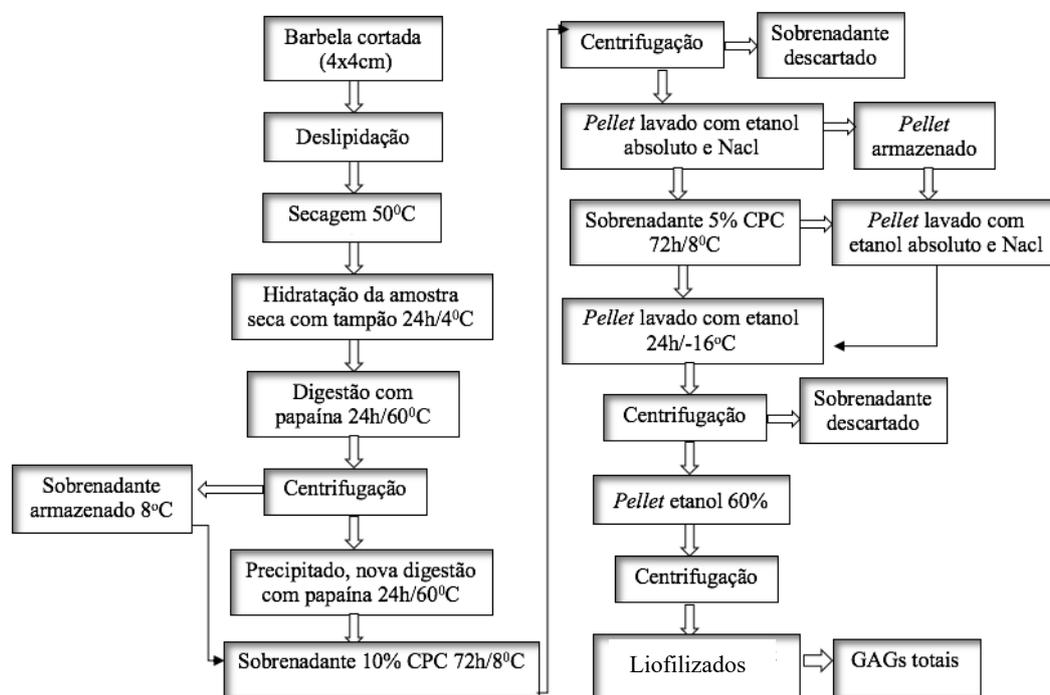
As determinações da composição proximal das barbelas foram realizadas em triplicata. A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, proteína pelo método de Kjeldahl, o teor lipídico pelo método de Soxhlet e o resíduo mineral fixo (cinzas) por incineração (AOAC, 2012). Os carboidratos foram determinados por diferença.

### **4.4 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS DAS BARBELAS DE PERU**

#### **4.4.1 Extração dos glicosaminoglicanos**

A extração dos GAGs foi realizada seguindo a metodologia de Cardoso et al., (1992) com modificações, conforme está ilustrado na Figura 4.

**Figura 4** - Etapas do processo de extração dos glicosaminoglicanos das barbelas de peru.



Fonte: Autor

As barbelas cortadas foram submetidas a duas etapas de deslipidação com a imersão de 1,5 kg de amostra em 500 mL de acetona por 24 h a 4 °C, seguido de imersão em 400 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) por 24 h a 25 °C, passado este período, o processo foi repetido nas mesmas condições citadas anteriormente. Concluídas as 48 h, o solvente foi decantado e as amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 50 °C durante a noite.

Os tecidos secos (370 mg) foram hidratados em tampão de digestão (acetato de sódio 100 mM pH 5,0, cisteína 5,0 mM e EDTA dissódico 5,0 mM) na proporção de 50 mg de amostra mL de tampão por 24 h a 4 °C. Após hidratação, os tecidos receberam solução de papaína (20 mg mL), preparada em solução tampão de digestão (conforme descrito anteriormente), numa proporção de 5mL para 100 mg de tecido seco. Os tecidos foram incubados por 24 h a 60 °C e centrifugados a 1789 x g por 30 min, após o sobrenadante foi retirado e armazenado, separadamente, enquanto que o precipitado resultante da incubação, foi submetido à uma nova digestão com papaína, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Aos sobrenadantes resultantes deste procedimento, foi adicionado cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10%, numa proporção de 2 mL para 100 mg de tecido seco e deixado em

repouso por 72 h a 8 °C. Ao final desta etapa, a amostra foi centrifugada (1789 x g), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 3,0 mL de solução de NaCl 2,0 M e etanol absoluto (100:15, v/v). O sobrenadante resultante foi precipitado novamente, utilizando-se 5% de CPC, numa proporção de 2 mL para 100 mg de tecido seco, e deixado em repouso por 72 h a 8 °C. Ao final desta etapa, a amostra foi centrifugada (1789 x g), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 3 mL de solução de NaCl 2,0 M e etanol absoluto (100:15, v/v). Aos *pellets* resultantes foram adicionados dois volumes de etanol absoluto e, após, foram deixados em repouso por 24 h a -16 °C. A amostra foi centrifugada (1789 x g por 30 min), após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado uma vez com 10 mL de etanol 80% e centrifugado novamente nas mesmas condições, em seguida o sobrenadante foi descartado, o *pellet* resultante do processo foi congelado a -18 °C e liofilizado, obtendo-se assim os GAGs totais.

#### **4.4.2 Determinação de glicosaminoglicanos sulfatados na presença do reagente 1-9 azul dimetilmetileno (DMB)**

A determinação dos GAGs sulfatados em presença do reagente de DMB (1,9 azul dimetilmetileno) foi realizada seguindo a metodologia de Farndale; Sayers; Barrett, (1982), com modificações. Foram homogeneizados, sob constante agitação, 1 g de formiato de sódio, 8 mg de DMB e 1 mL de ácido fórmico. Após, 500 mL de água destilada foram adicionados, a solução foi agitada por 15 min e, em seguida, a mesma foi filtrada (filtro de papel Waters nº 5), acondicionada em vidro âmbar com ausência de luz e armazenada em temperatura ambiente (22 °C) por 24 h.

Em tubo de ensaio, foram adicionados 100 µL da amostra e 2,5 mL de solução de DMB, seguido de agitação manual. A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro (BEL Photonics UV- M51) em comprimento de onda de 525 nm.

#### **4.4.3 Determinação de ácido urônico, com reagente de carbazol**

A concentração do ácido urônico das frações foi determinada por método químico, utilizando-se o reagente colorimétrico carbazol, seguindo-se a metodologia de Dische (1946) com modificações.

À 100 µL de amostra foram adicionados 1,0 mL de ácido sulfúrico e 0,4% de tetraborato de sódio. Posteriormente, os tubos foram fechados, aquecidos por 10 min a 100 °C e resfriados à temperatura ambiente (22 °C) por 20 min. Na sequência, foram adicionados 40 µL da solução de 0,125 % de carbazol em 0,1% de etanol, então, foram aquecidos novamente por 12 min a 100 °C e resfriados à temperatura ambiente (22 °C) por 20 min. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (BEL Photonics UV-M51) em comprimento de onda de 525 nm.

A concentração do ácido hialurônico (AH) foi determinada por meio de uma curva de calibração previamente construída com o AH padrão de crista de galo (Sigma-Aldrich). A curva padrão foi feita com diferentes concentrações de AH de 1,5-5,0µg.

#### 4.4.4 Agrupamento dos glicosaminoglicanos em frações

Todas as alíquotas coletadas durante a cromatografia de troca iônica, foram analisadas individualmente com relação ao percentual de ácido urônico e a presença de GAGs sulfatados. Com base nos resultados, essas alíquotas foram agrupadas em sete frações. As frações foram dialisadas exaustivamente com água destilada, através de uma membrana de corte 3,5 kDa (Inlab), e liofilizadas para utilização em ensaios posteriores.

#### 4.4.5 Rendimento de glicosaminoglicanos

O rendimento da extração dos glicosaminoglicanos foi calculado de acordo com a equação 1.

(Eq. 1)

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{peso seco de GAGs totais (g)}}{\text{peso da barbela (g)}} \times 100$$

### 4.5 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os GAGs foram identificados por espectros de RMN, obtidos em espectrômetro BRUKER modelo DPX-400SF. Para aquisição do espectro de RMN de <sup>13</sup>C foi utilizado o solvente deuterado D<sub>2</sub>O, tendo como referência interna o 4,4dimetil-4silapentano-1-sulfonato de sódio. Os parâmetros experimentais do equipamento para aquisição do espectro do composto obtido foram: 400,13 MHz para <sup>1</sup>H e 100,23 para <sup>13</sup>C; largura de pulso 90°, 8.0 µs

(<sup>13</sup>C); janela espectral 965 Hz (<sup>1</sup>H) e 5000 Hz (<sup>13</sup>C); número de varreduras 8-32 para <sup>1</sup>H e 2000-20000 para <sup>13</sup>C, dependendo do composto; número de pontos 65536 com resolução digital Hz/ponto <sup>1</sup>H igual a 0,677065 (<sup>1</sup>H) e 0,371260 (<sup>13</sup>C); e temperatura de 50 °C.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE INTRINSECA E MASSA MOLAR

A determinação da viscosidade intrínseca foi realizada com 20 mg da fração F-V. As análises foram realizadas em viscosímetro capilar (marca CANNON 100-Y-44), acoplado a um banho termostatizado com controle de temperatura (20 °C), utilizando água como solvente. A viscosidade foi determinada a partir do cálculo das viscosidades relativa e reduzida, conforme as equações da Tabela 3, sendo t, tempo de fluxo da solução polimérica; t<sub>0</sub>, tempo de fluxo do solvente; e c, concentração da solução polimérica.

**Tabela 3** – Equação para construção do gráfico para viscosidade intrínseca.

Viscosidades	Equações
Viscosidade relativa	rel.= t/t <sub>0</sub>
Viscosidade reduzida	red.= ( rel.-1)/c
Viscosidade intrínseca	int.= $\lim_{c \rightarrow 0} ( \text{red.} )$

A massa molar viscosimétrica média foi estimada através da relação com a viscosidade intrínseca, descrita pela equação 2, sendo k, constante dependente da geometria da ligação entre resíduos internos da cadeia polimérica; a, constante dependente do solvente utilizado; e η, viscosidade intrínseca.

(Eq. 2)

$$\eta = k (M_v)^a$$

As constantes de (MHKS) adotadas foram k = 5,075 x 10<sup>-2</sup> e a = 0,716 sendo estas indicadas para soluções aquosas (GURA; HÜCKEL; MÜLLER, 1998).

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO POR GRUPO SULFATO (DS)

A dosagem de sulfato foi realizada por método turbidimétrico, nas frações de GAGs totais, F-V e F-VII, seguindo a metodologia de Price (1962). Em 40 mL de água

destilada aquecida (60 – 70 °C) foram solubilizados 200 mg de gelatina. A solução foi resfriada e mantida a 8 °C por 12 h. Em seguida foram adicionados 200 mg de cloreto de bário sob agitação lenta e novamente a solução foi submetida à refrigeração por mais 2 h.

As frações de GAGs totais, F-V e F-VII (3,3 mg) foram submetidas à hidrólise ácida, utilizando-se HCl 1 M (1mg/mL), a 105-110 °C por 5 h. Na sequência, 0,2 mL da amostra hidrolisada foram tratados com 3,8 mL de ácido tricloroacético 3 % (p/v) e 1,0 mL de solução de cloreto de bário-gelatina. Passados 15 min a 22 °C, foi determinada a absorvância em espectrofotômetro (360 nm) para cada fração (triplicata). O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (30 a 180 µg/mL). O grau de substituição das unidades monossacarídicas por grupos sulfato foi calculado utilizando a equação (3) (WOLFROM, 1962).

(Eq. 3)

$$DS = \frac{138 \times S}{3200 - (102 \times S)}$$

Onde; 138 é a massa molar média das unidades monossacarídicas; 3200 é a massa molar do enxofre (32 g) x 100; 102,1 mol do éster substituinte (SO<sub>3</sub>Na); S, teor de enxofre dado em porcentagem.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS FRAÇÕES DOS GLICOSAMINOGLICANOS DA BARBELA DE PERU

##### 4.8.1 Atividade anticoagulante *in vitro*

A atividade anticoagulante da amostra de GAGs totais e das frações de F-V e F-VII foram determinadas com o kit aPTT-SP Hemosil® (Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 EUA), em coagulômetro coag-a-mate® xm (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC), utilizando um conjunto de plasma de carneiro.

Em um tubo foram adicionados 50 µL de plasma, 50 µL solução salina (soro fisiológico), e 50 µL das frações (GAGs totais, F-V e F-VII), em diferentes concentrações, e foram mantidas em banho à 37 °C. Após 60 s, 50 µL do reagente aPTT (tempo de tromboplastina parcialmente ativada) foram adicionados e incubados por 150 s a temperatura ambiente (22 °C). Posteriormente, foram adicionados 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 25 mM e, então, o tempo de coagulação foi medido (tempo máximo = 300 s). Para cada teste foi determinada a média do aPTT.

#### **4.8.2 Inibição da atividade anticoagulante com protamina**

O ensaio de inibição da atividade anticoagulante com protamina foi realizado nas amostras de GAGs totais, F-V e F-VII. Para a análise foi utilizado o coagulômetro COAG-A-MATE® XM (Organon Teknika Corporation, Durhan, NC) e o kit HemosiL® (Instrumentation Laboratory) para aPTT.

Foi utilizado 100 µL de plasma ovino, incubados a 37 °C por 1 min com 9,6 µg/mL de solução salina (soro fisiológico), acrescidos de 9,6 µg/mL de protamina. Em seguida, 100 µL de cefalina de coelho foram adicionados. Após 2,5 min foi adicionado 100 µL de CaCl<sub>2</sub> a 25 mM e o tempo de coagulação foi determinado.

#### **4.8.3 Teste de citotoxicidade/atividade antiproliferativa**

As células HepG2/C3A, derivadas de carcinoma hepatocelular humano, e 786-0, derivadas de adenocarcinoma renal humano, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen - Carlsbad, CA, EUA) e 1 mL/L de antibiótico/solução antimicótica, e mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, 95% de umidade, a 37° C).

Foram testadas as frações de GAGs totais, a fração F-V, que corresponde ao ácido hialurônico (AH), e a fração F-VII, que corresponde ao sulfato de condroitina e sulfato de dermatana, obtidos das barbas de peru (*Melagris gallopavo*). Estes foram diluídas em meio de cultura DMEM e, então, foram utilizados para o preparo dos seguintes tratamentos: 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µg/mL de meio de cultura (GAGs totais) e 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL de meio de cultura (F-V e F-VII).

O ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-diphenil tetrazolium bromide], foi realizado conforme a metodologia de Mosmann, (1983). Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas 10<sup>4</sup> células HepG2/C3A ou 786-0, com exceção dos poços controle sem células (branco). As células foram cultivadas por 24 h com 100 µL de meio de cultura. Após este período, o meio de cultura da placa foi descartado e foi adicionado 100µL de meio novo com os tratamentos: controle negativo (CO-) (meio de cultura), tratamento com o agente citotóxico metil

metanossulfonato (MMS) (CO+) (concentração final de 75  $\mu$ M), e as diferentes concentrações de GAGs, F-V e F-VII.

As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h e, após este tempo, o meio de cultura foi substituído por 100  $\mu$ L de meio livre de soro, acrescido de MTT na concentração de 0,167 mg/mL. A placa foi incubada por mais 4 h e, na sequência, o meio contendo MTT foi descartado e aos poços foram adicionados 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO), ocorrendo a diluição dos cristais de formazan formados. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (FlexStation) a 550 nm.

Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados através da Equação 4, onde VC, viabilidade celular [%];  $ABS_T$ , absorbância média do tratamento;  $ABS_C$ , absorbância média do controle negativo.

(Eq.4)

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

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tratados por teste de variação de média de Tukey considerando um nível de 95% de confiança, usando o software *Statistica 7.0*. Os dados das médias das absorbâncias obtidas nas três repetições biológicas foram analisados por análise de variância (one way ANOVA), seguido pelo teste de Dunnet ( $\alpha=0,05$ ,  $p<0,05$ ,  $n=3$ ), pelo Programa GraphPad InStat. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS BARBELAS DE PERU

A composição proximal das barbelas de peru usadas para extração de glicosaminoglicanos, estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4** Composição proximal das barbelas de peru antes da escaldagem.

	Média (bu) g (%)	Média (bs) g (%)
<b>Umidade</b>	79,22 ± 0,05	-
<b>Proteína</b>	17,84 ± 0,04	85,85
<b>Cinzas</b>	0,30 ± 0,01	1,44
<b>Lipídeos</b>	2,18 ± 0,09	10,49
<b>Carboidratos</b>	0,46 ± 0,03	2,22

\* Média ± desvio padrão

\*\*bu: base úmida; bs: base seca

A composição proximal das barbelas de peru apresenta valores semelhantes ao da crista de galo, relatado por Swann (1968) e Rosa et al (2008). Pode-se observar que a barbela apresenta 2,22 % de carboidratos enquanto a crista de galo apresenta 2,09 %, segundo dados apresentados por Rosa et al., (2008). O teor lipídico da barbela é de 10,49 % de lipídeos, o que demonstra a necessidade de realizar a etapa de deslipidação, antes de iniciar a extração dos glicosaminoglicanos.

A barbela de peru é um subproduto dos abatedouros, que é descartada juntamente com as vísceras e penas, seguindo para autoclaves e digestores, para a extração do óleo, posterior cozimento, onde são transformados em farinha animal (NETO, 1994). Tendo em vista a similaridade entre as barbelas de peru e a crista de galo, no que diz respeito ao tecido, coloração e composição proximal e, em especial, o teor de hidratos de carbono, verifica-se que a barbela do peru tem potencial para ser uma nova fonte para a extração de glicosaminoglicanos, em especial o ácido hialurônico.

### 5.2 EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DE GLICOSAMINOGLICANOS

O tempo médio de extração de glicosaminoglicanos foi de 13 dias, sendo que a etapa de precipitação precisou ser um pouco mais longa que o relatado na literatura. O tempo de precipitação com cloreto de cetilpiridínio (CPC) comumente é 48 h, no entanto, devido ao

pouco material precipitado neste período, esta etapa foi prolongada para 72 h. Segundo Rani; Baruah; Goyal (2017) a extração de GAGs é um processo de alto custo e de baixo rendimento.

O CPC é um detergente catiônico hidrofílico que possui alta capacidade para se ligar se aos GAGs (MACCARI; FERRARINI; VOLPI, 2010). O AH sendo uma molécula carregada negativamente pode ser mais facilmente precipitada com o CPC, por formar um sal e auxiliar na eliminação de vários contaminantes, que podem interferir no rendimento e na qualidade do AH produzido (NAKANO, 2001; PANAGOS et al., 2014).

Após o processo de extração, obteve-se os glicosaminoglicanos totais da barbeta do peru e o rendimento obtido foi de 2,7% de material seco. O elevado rendimento obtido neste estudo, pode estar relacionado com a etapa de precipitação prolongada. Esse rendimento foi superior ao relatado em outros trabalhos. O rendimento de Liu et al. (2018), foi de 1% em GAGs extraídos de caramujo (*Achantina fulica*) e Sila et al., (2018) 1,22% em GAGs de enguia europeia (*Anguilla anguilla*).

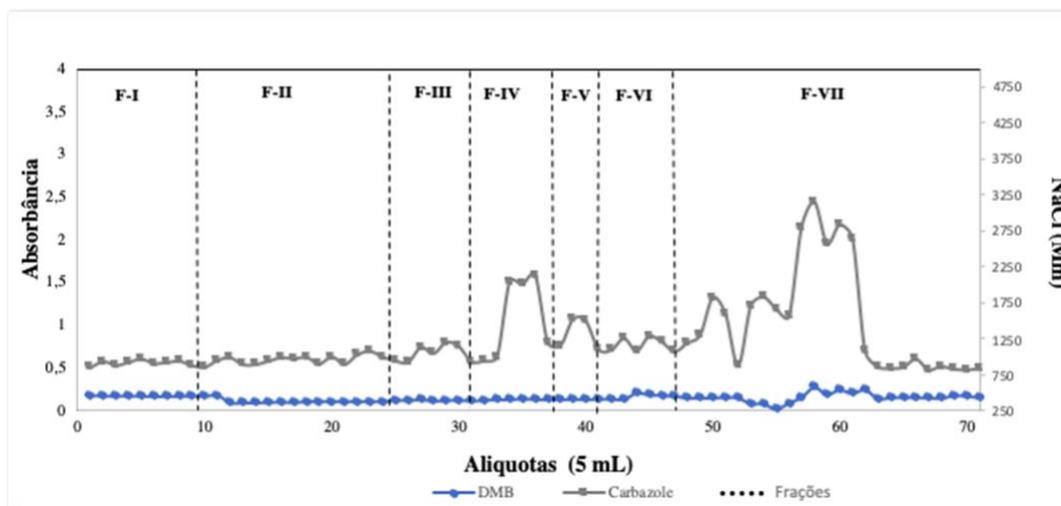
### 5.3 FRACIONAMENTO DOS GLICOSAMINOGLICANOS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Os GAGs totais da barbeta de peru foram adicionados à coluna de troca iônica, com resina DEAE- *Sepharose Fast Flow* e eluídos em gradientes de NaCl de 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0 mol. Os polissacarídeos negativos ligados a resina foram carregados pelos gradientes de NaCl conforme a afinidade de cada GAG. As alíquotas (5 mL), foram coletadas produzindo setenta tubos, os quais, foram monitorados, quanto a presença de ácido urônico pelo método de carbazol e de grupo sulfato com reagente de DMB.

O método de determinação por ácido urônico é eficiente para a detecção de ácido  $\beta$ -D-glucurônico e  $\alpha$ -L-idurônico, em diferentes conformações espaciais do ácido urônico, presente nas amostras (DISCHE, 1946). O sulfato de queratana é o único dos GAGs que não possui nenhuma conformação espacial de ácido urônico em sua estrutura (POMIN, 2015a).

Na Figura 5 está apresentado o fracionamento dos GAGs da barbeta de peru e a determinação de ácido urônico e dos GAGs sulfatados com reagente de DMB nas frações. Conforme os resultados apresentados no gráfico, as amostras apresentaram alguns picos nas análises de DMB (F-VI e VII) e carbazol (F-IV, V, VI e VII), estes foram confrontados com as absorvâncias e coloração das amostras (Tabela 5), denotando que os GAGs poderiam estar presentes. Sendo assim, as alíquotas, foram agrupadas em sete frações.

**Figura 5** - Fracionamento dos glicosaminoglicanos da barbela do peru com cromatografia de troca iônica e determinação de ácido urônico e determinação de GAGs sulfatados com reagente de DMB.



Os resultados apresentados na determinação de ácido urônico, exibem dois picos nas frações F-IV e V, eluídas em 0,75 e 1,0 M de NaCl e nas F-VI e VII, eluídas com 2,0 M de NaCl. Na análise de GAGs sulfatados com reagente de DMB a única fração que apresentou metacromasia foi a F-VII (eluída em 4,0 M de NaCl), indicando a presença de GAGs sulfatados. Conforme os dados apresentados na (Figura 5 e Tabela 5) pode-se sugerir que os GAGs sulfatados presentes estão na F-VII. O reagente de DMB é um corante catiônico, com propriedade metacromáticas, que se liga especificamente aos grupos sulfatados. Quando o grupo sulfato reage na presença do reagente de DMB, ocorre uma desprotonação dos grupos carboxil, gerando a metacromasia de azul para lilás (FARNDALE; BUTTLE; BARRETT, 1986).

Apesar do resultado obtido na determinação de ácido urônico com reagente de carbazol apresentar quatro picos (F-IV, V, VI e VII), detectando sua presença, este resultado não se confirma na determinação de GAGs sulfatados por reagente de DMB, onde ocorreu metacromasia somente na F-VII.

A reação de ácidos urônicos com reagente de carbazol é um método de coloração instável e sensível ao aquecimento e na presença de alguns componentes, a coloração pode ser parcialmente influenciada por íons de cloreto e sais (BITTER; MUIR, 1962). As determinações de ácido urônico e GAGs sulfatados, são utilizadas para monitoramento e fracionamento dos GAGs.

**Tabela 5** - Frações obtidas durante a cromatografia de troca iônica.

Fração	Alíquotas (5 mL)	NaCl (M)	Ácido urônico*	GAGs sulfatados**
I	1 a 10	0,25		
II	11 a 24	0,50		
III	25 a 32	0,75		
IV	33 a 38	0,75 e 1,00		
V	39 a 42	1,00		
VI	43 a 47	2,00		
VII	48 a 70	4,00		

\*Imagens das cubetas ao final da determinação de ácido urônico com reagente de carbazol.

\*\* Imagens das cubetas ao final da análise de GAGs sulfatados com reagente de DMB (1,9 azul dimetilmetileno).

### 5.3.1 Identificação de glicosaminoglicanos por ressonância magnética nuclear – RMN

A espectroscopia de RMN é uma ferramenta útil na caracterização de estruturas de carboidratos onde parâmetros como conteúdo de açúcar, conformação de anel, ligações glicosídicas e padrão de sulfatação podem ser determinados pela análise dos deslocamentos químicos, constantes de acoplamento e correlações a curta e longa distância (POMIN, 2015b). O espectro de HSQC apresenta o acoplamento do espectro de carbono e hidrogênio e seus respectivos deslocamentos, enquanto no espectro de COSY é possível visualizar os átomos de carbono que estão acoplados entre si (POMIN, 2015). Confrontando todos os espectros foi possível identificar quais os GAGs que estavam presentes nas frações.

O espectro de RMN foi realizado após a fracionamento e diálise dos GAGs em todas as frações, e os resultados demonstraram que apenas as frações F-V e F-VII possuem sinais característicos de GAGs. Sendo assim, os espectros das frações F-V e F-VII foram caracterizados.

### 5.3.3.1 Caracterização dos glicosaminoglicanos da F-V

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ , COSY e HSQC da fração F-V caracterizou a amostra como sendo ácido hialurônico. Os sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 6) foram comparados com dados da literatura (TOFFANIN et al., 1993; PANAGOS et al., 2014b) e com dados de uma amostra comercial de AH de crista de galo (Sigma-Aldrich).

**Tabela 6** - RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) da fração F-V comparados com dados da literatura.

	F-V	Lit <sup>a</sup>
<b>GlcNAc</b>		
<b>H1/C1</b>	4,56/100,71	4,59/103,21
<b>H2/C2</b>	3,80/54,65	3,84/57,09
<b>H3/C3</b>	3,70/83,13	3,72/85,62
<b>H4/C4</b>	3,46/68,95	3,52/71,43
<b>H5/C5</b>	3,46/75,79	3,49/78,25
<b>H6/C6</b>	3,70- 3,89/61,05	3,76–3,92/63,50
<b>Me</b>	2,00/22,87	
<b>Ac</b>	175,21	
<b>GlcA</b>		
<b>H1/C1</b>	4,46/103,50	4,47/105,88
<b>H2/C2</b>	3,32/72,95	3,35/75,37
<b>H3/C3</b>	3,54/74,03	3,58/76,56
<b>H4/C4</b>	3,70/80,34	3,76/82,84
<b>H5/C5</b>	3,70/76,71	3,72/79,22
<b>C6</b>	174,27	177,68

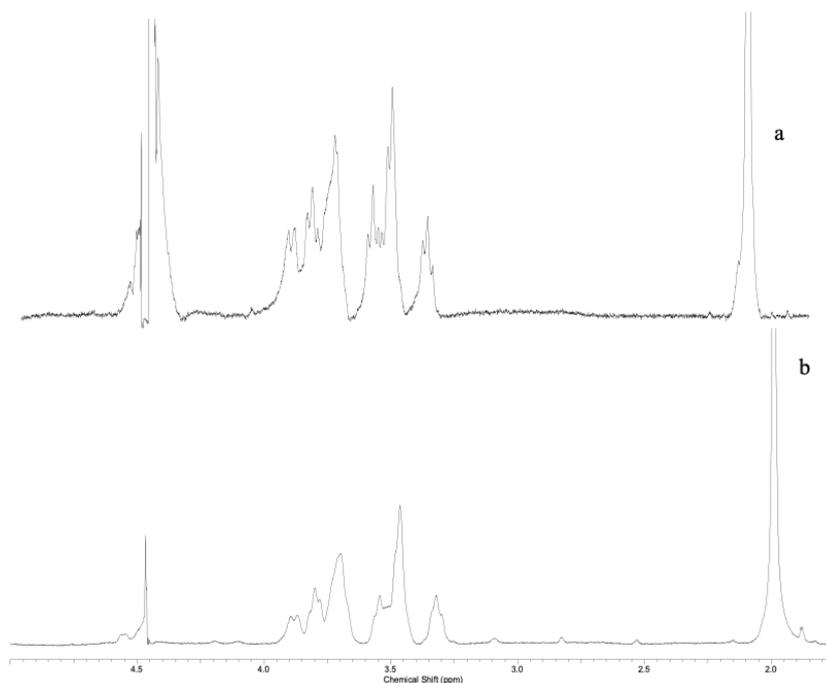
<sup>a</sup> Dados obtidos de PANAGOS et al., (2014b)

No espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 6) os sinais em  $\delta$  1,99 e 4,56 ppm foram atribuídos ao grupo acetamida e ao hidrogênio anômérico da unidade GlcNAc (*N*-acetil-*D*-galactosamina). O sinal em 3,32 foi atribuído ao H-2 da unidade GlcA (ácido- $\beta$ -*D*-glucurônico). Os demais sinais foram atribuídos com a análise conjunta dos espectros HSQC (Figura 7) e COSY (Figura 8). No espectro HSQC (Figura 7) estão assinaladas todas as correlações entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a F-V que estão de acordo como a literatura (PANAGOS et al., 2014b).

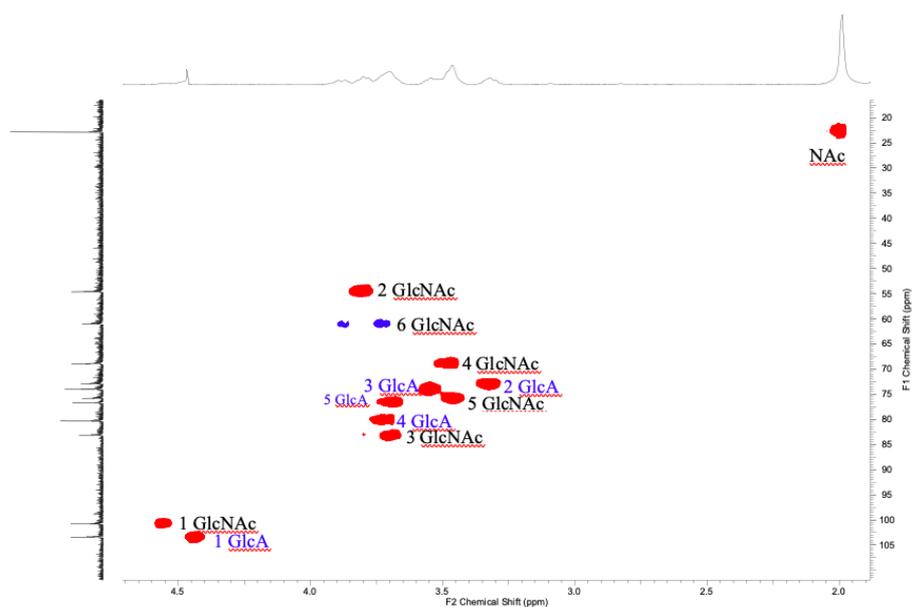
A unidade GlcNAc foi caracterizada por meio dos sinais 4,56/100,71 (H1/C1), 3,80/54,65 (H2/C2) e 3,70-3,89/61,05 (H6/C6). As correlações H1-H2, H2-H3 e H3-H4 para a GlcNAc estão mostradas no espectro COSY. O espectro HSQC apresentou sinais em

4,46/103,50 (H1/C1) e 3,32/72,95 (H2/C2) que foram atribuídos à unidade GlcA. O espectro COSY mostrou a correlação H1-H2 corroborando com as atribuições para a GlcNac. Os dados de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  para as unidades GlcA e GalNAc (Tabela 6) se mostraram em boa concordância quando comparados com os dados da literatura (TOFFANIN et al., 1993).

**Figura 6** – Espectro de RMN-1H AH padrão (a) e F-V (b), em D<sub>2</sub>O.

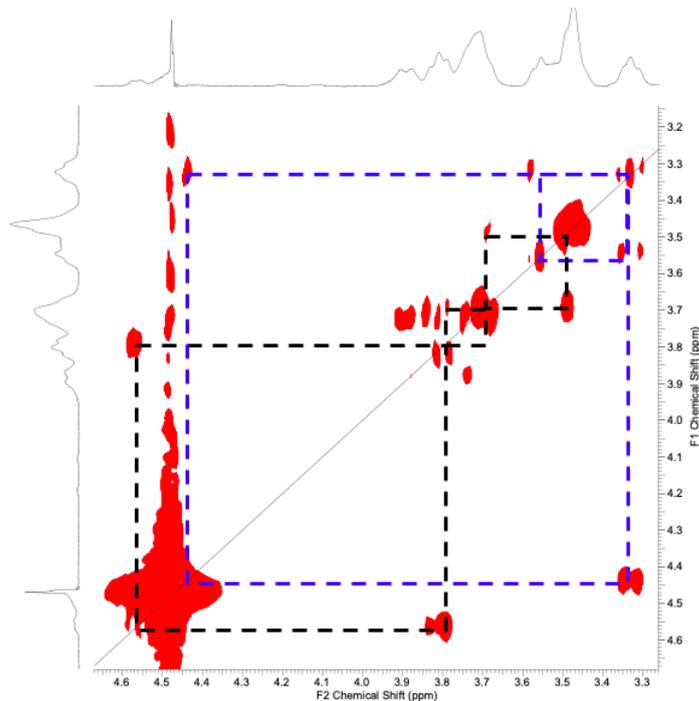


**Figura 7** Espectro HSQC da F-V em D<sub>2</sub>O. Espectro de  $^{13}\text{C}$  ao lado.



\*(GlcNAc) N-acetil-D-galactosamina; (GlcA) ácido- $\beta$ -D-glucurônico

**Figura 8** Espectro COSY da F-V, em D2O. (---) GlcNAc e (---) GlcA

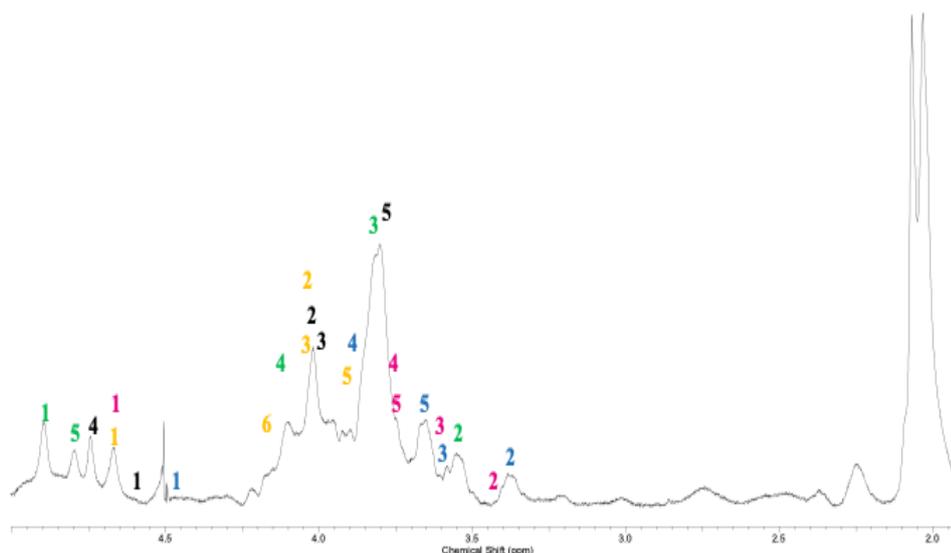


(GlcNAc) *N*-acetil-*D*-galactosamina; (GlcA) ácido- $\beta$ -*D*-glucurônico.

#### 5.3.1.1 Caracterização dos glicosaminoglicanos da F-VII

A análise de RMN 1D e 2D pode ser utilizada para se obter informações como a posição e o grau de sulfatação ou, ainda, sobre a composição de ácidos urônicos de várias famílias de GAGs sulfatados (TOIDA; TOYODA; IMANARI, 1993). A análise de RMN da F-VII obtida da barbeta de peru, mostrou a presença de GAGs sulfatados. Neste caso foi possível reconhecer partes de cadeias de sulfato de condroitina (SC) e sulfato de dermatana (SD) e determinar os respectivos valores de deslocamento químico. Os tipos principais de sulfato de condroitina (SC) foram identificados como SC-4 (GlcA- GalNAc4S) ácido- $\beta$ -*D*-glucurônico e *N*-acetil-*D*-galactosamina-4-sulfato, e SC-6 (GlcA-GalNAc6S) ácido- $\beta$ -*D*-glucurônico e *N*-acetil-*D*-galactosamina-6-sulfato. O sulfato de dermatana (SD) foi caracterizado como ácido  $\alpha$  L-idurônico e *N*-acetil-*D*-galactosamina-4-sulfato (IdoA-GalNAc4S). A análise de RMN da F-VII foi incapaz de determinar se a fração é uma mistura de SC e SD ou se apresenta a cadeia híbrida SC/SD. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 9) foi analisado em conjunto com os espectros COSY (Figura 10) e HSQC (Fig. 11).

**Figura 9** – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da FVII, em D<sub>2</sub>O. (---) IdoA, (---) GlcA, (---) GalNAc4S, (---) GalNAc6S e (---) GlcA(6S).



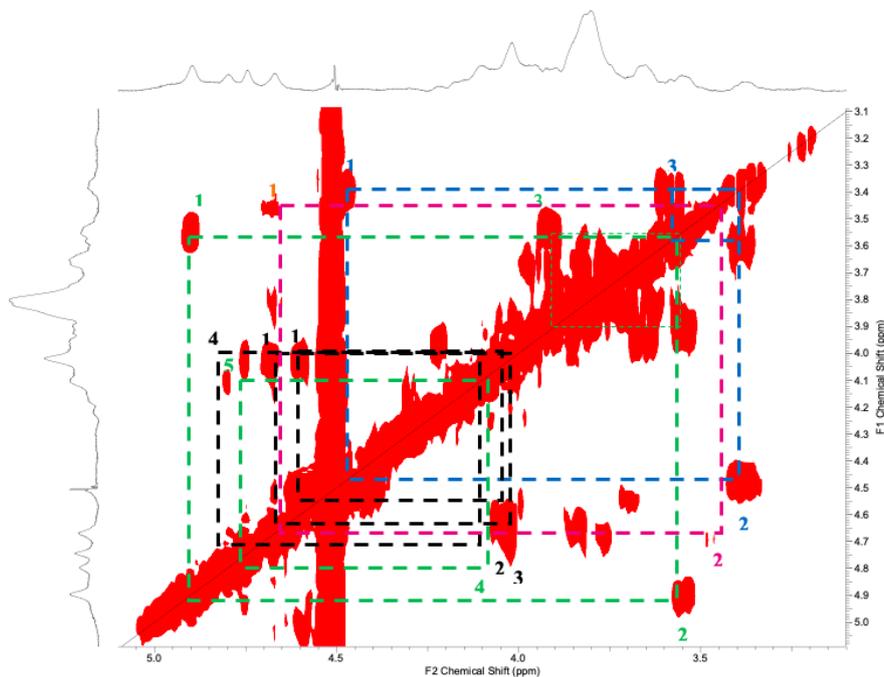
\*(IdoA) – ácido  $\alpha$  L-idurônico; (GlcA)- ácido- $\beta$ -D-glucurônico; (GalNAc4S) – *N*-acetil-*D*-galactosamina-4-sulfato; (GalNAc6S) - *N*-acetil-*D*-galactosamina-6-sulfato; (GlcA(6S)) - *N*-acetil-*D*-galactosamina-4,6-Di-sulfato

A presença das unidades GlcA e IdoA ligadas a GalNAc4S resultou em dois conjuntos de sinais com uma pequena diferença de deslocamento químico para H1/C1 e H4/C4 da unidade GalNAc4S, como pode ser observado no HSQC (PANAGOS et al., 2014b). A unidade de ácido L-idurônico (IdoA), foi caracterizada principalmente por meio dos sinais relativos das correlações entre 4,90 e 103,32 ppm (H1/C1) e entre 4,80 e 69,70 ppm (H5/C5) no espectro HSQC.

No espectro COSY foram observadas as correlações entre H1/H2, H2/H3 e H4/H5. Para a unidade de ácido D-glucurônico (GlcA) foram observadas no HSQC as correlações entre 4,43 e 104,10 ppm (H1/C1), 3,38 e 72,64 ppm (H2/C2) com as atribuições confirmadas pela correlação apresentada por H1/H2 no espectro de COSY. A presença das unidades GalNAc sulfatadas na posição 4 e 6 puderam ser confirmadas pelas correlações 3,80/61,32 e 4,12/67,83, no HSQC, pertencentes aos H6/C6 da GalNAc4S e GalNAc6S, respectivamente.

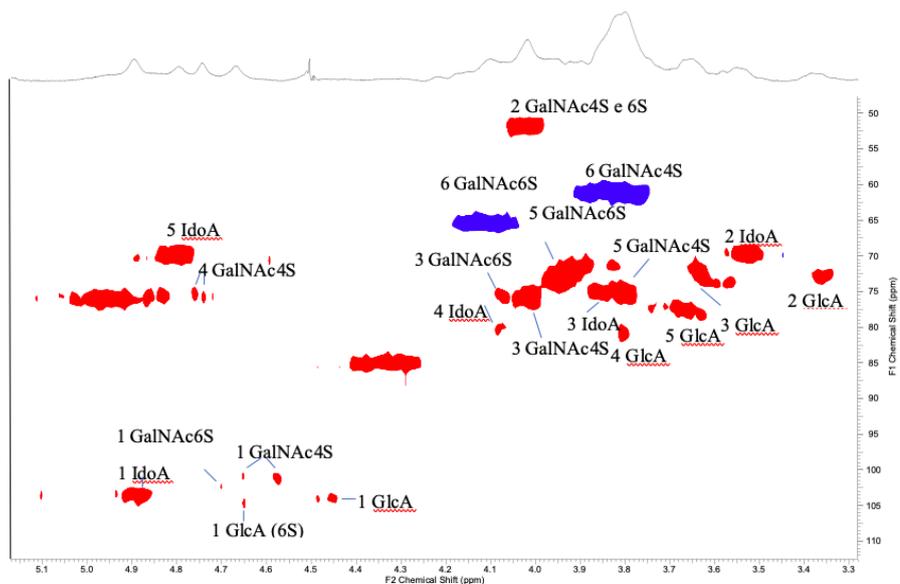
As demais atribuições do RMN da F-VII são demonstradas na Tabela 7 e estão em concordância com os dados descritos na literatura (HUCKERBY et al., 2001; PANAGOS; THOMSON; BAVINGTON, 2012; PANAGOS et al., 2014).

**Figura 10** - Espectro COSY da F-VII, em D<sub>2</sub>O. (---) IdoA, (---) GlcA, (---) GalNAc4S e (---) GlcA(6S).



\*(IdoA) – ácido  $\alpha$  L-idurônico; (GlcA)- ácido- $\beta$ -D-glucurônico; (GalNAc4S) – *N*-acetil-*D*-galactosamina-4-sulfato; (GlcA(6S) - *N*-acetil- *D*-glucurônico -6-sulfato;

**Figura 11** – Espectro HSQC da F-VII, em D<sub>2</sub>O



\*(IdoA) – ácido  $\alpha$  L-idurônico; (GlcA)- ácido- $\beta$ -D-glucurônico; (GalNAc4S) – *N*-acetil-*D*-galactosamina-4-sulfato; (GalNAc6S) - *N*-acetil-*D*-galactosamina-6-sulfato; (GlcA(6S)- *N*-acetil-*D*-galactosamina-4,6-Di-sulfato

Tabela 7 -RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (ppm) da fração F-VII.

	<b>GalNAc4S</b>	<b>GalNAc6S</b>	<b>GlcA</b>	<b>GlcA (6S)</b>	<b>IdoA</b>
<b>H1/C1</b>	4,60/101,13	4,67/101,39	4,43/104,10	4,67/104,53	4,90/103,32
<b>H2/C2</b>	4,02/51,90	4,03/51,90	3,38/72,64	3,47/72,64	3,55/69,61
<b>H3/C3</b>	4,01/75,68	4,06/75,42	3,58/73,59	3,57/73,77	3,80/75,05
<b>H4/C4</b>	4,75/75,36	4,18/65,62	3,82/80,76	ni	4,10/80,14
<b>H5/C5</b>	3,82/74,95	3,94/74,25	3,65/77,36	ni	4,80/69,70
<b>H6/C6</b>	3,80/61,32	4,12/67,83	-174,50	-174,48	ni
<b>Me</b>	2,03/22,63	2,07/22,63	-	-	-
<b>Ac</b>	175,20	175,28	-	-	-

ni - não identificado; (IdoA) – ácido  $\alpha$  L-idurônico; (GlcA)- ácido- $\beta$ -D-glucurônico; (GalNAc4S) – *N*-acetil-*D*-galactosamina-4-sulfato; (GalNAc6S) - *N*-acetil-*D*-galactosamina-6-sulfato; (GlcA(6S)- *N*-acetil-*D*-galactosamina-4,6-Di-sulfato

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO URÔNICO COM REAGENTE DE CARBAZOL

A concentração de ácido hialurônico na barbeta de peru foi de 11,70  $\mu\text{g}$  de AH mg de tecido seco, em animais de 145 dias. O valor encontrado é menor que o relatado por Nakano et al. (1994), que obteve em barbelas de galo 19,1  $\mu\text{g}$  AH mg de tecido seco, em animais de 364 dias. Rosa et al., (2008) quantificou na crista de galo 14,9  $\mu\text{g}$  de AH mg de tecido seco em animais de 45 dias. A concentração de ácido hialurônico presente no tecido da crista e barbeta de galo, pode ser influenciada pela idade e sexo dos animais, sendo que os machos possuem quantidade superior de AH (NAKANO; SIM 1991).

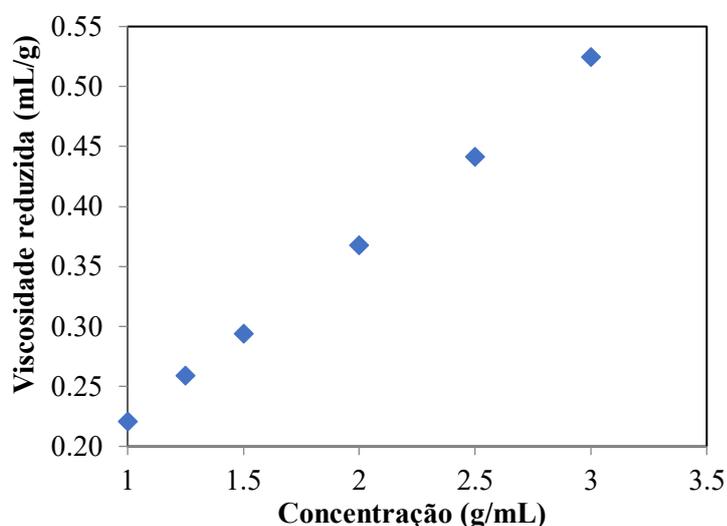
O AH presente em tecidos animais está complexado com proteoglicanos e isso dificulta a obtenção de um material com alto grau de pureza. O AH e os polissacarídeos sulfatados não estão distribuídos homogeneamente entre as diferentes estruturas anatômicas da crista dificultando sua obtenção (NAKANO; SIM, 1988). Tendo em vista a quantidade de peru abatido nos frigoríficos brasileiros, a extração de AH pode ser uma alternativa para a valorização das barbelas de peru, que hoje é um subproduto da industrialização com baixo valor econômico.

#### 5.5 VISCOSIDADE INTRÍNSECA E MASSA MOLAR

A viscosidade intrínseca é uma medida do volume hidrodinâmico ocupado por uma macromolécula em solução e, portanto, uma reflexão do seu tamanho. A conformação da molécula do AH é dependente da massa molar do AH (BOTHNER et al., 1988). Os valores da viscosidade intrínseca são comumente utilizados para determinação da massa molar do ácido hialurônico (HOKPUTSA et al., 2003).

A viscosidade intrínseca do ácido hialurônico foi determinada a partir dos valores de viscosidade reduzida, calculados pelas relações apresentadas na Tabela 3. Com base nos resultados, obteve-se a Figura 12. A viscosidade intrínseca foi determinada como sendo de 732 mL/mg e está relacionada com o valor da massa molar, quanto maior a viscosidade, mais alta é a massa molar do ácido hialurônico (KIM et al., 2018).

**Figura 12** - Viscosidade reduzida versus a concentração de ácido hialurônico extraído da barbela de peru.



O resultado da viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionado com a massa molar viscosimétrica média. A massa molar do AH extraído foi calculada seguindo a equação 2 de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (ARMSTRONG; COONEY; JOHNS, 1997).

A massa molar do AH varia de milhares a milhões de Daltons, a depender do comprimento da cadeia, e depende de vários fatores, tais como: o tipo de matéria-prima e o processo de extração (TAVIANATOU et al., 2019). O grau de pureza, a qualidade e a elasticidade são fatores que estão inteiramente relacionados com a massa molar, quanto maior, mais puro é o AH e, conseqüentemente, seu valor comercial será superior em relação aos de baixa massa molar (BORSCHIVER et al., 2018).

A massa molar média calculada para o AH extraído da barbela de peru, foi considerada alta  $1,0 \times 10^6$  Da. Os valores obtidos no presente estudo concordam com a massa molar média relatada na literatura para AH extraído da crista de galo, que está na faixa de 1,0

$\times 10^6$  a  $1,2 \times 10^5$  Da (SWANN, 1967; KHANMOHAMMADI et al., 2014b). O AH da barbeta de peru também apresentou massa molar superior a outras fontes, como os obtidos por processo de fermentação microbiana ( $8,0 \times 10^5 - 9,0 \times 10^5$  Da) (ALVES et al., 2017).

O ácido hialurônico para aplicações médicas deve em todos os casos ter um elevado grau de pureza e massa molar adequada de acordo com a especificidade de sua aplicação (ABDALLAH et al., 2020). O AH empregado em implantes ósseos, como lubrificante nas superfícies das articulares e na terapia de osteoartrose possuem massa molar de  $6 \times 10^5$  a  $1,2 \times 10^6$  Da, já o aplicado em cirurgias oftalmológicas, é em torno de  $6 \times 10^5$  a  $2,3 \times 10^6$  Da (ASARI; MIYAUCHI, 2000). O AH de alta e muito alta massa molar, são destinados aos tratamentos mais invasivos, devido ao seus efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativo e anticarcinogênico (TAVIANATOU et al., 2019). No entanto, o AH empregado na fabricação de cosméticos e aplicações estéticas são de baixa ( $1$  a  $25 \times 10^4$  Da) e média ( $10$  a  $25 \times 10^5$  Da) massa molar, de acordo com a finalidade e característica que se deseja para o uso (GRAÇA et al., 2020).

Entretanto, o AH de alta massa molar, da ordem de  $10^6$  Da, possui um elevado valor comercial (US\$ 65,00/100mL), e ainda não é produzido no Brasil (ALVES et al., 2017; BORSCHIVER et al., 2018).

## 5.6 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO POR GRUPO SULFATO (DS)

O potencial bioativo de polissacarídeos está relacionado com o percentual de grupos sulfatos na molécula, principalmente, aqueles relacionados à coagulação sanguínea. A interação das cargas negativas dos agrupamentos sulfatos com as cargas positivas de sequências peptídicas de proteínas regula o processo de coagulação sanguínea (SCHOEN et al., 1990). Um dos fatores influenciadores da atividade anticoagulante dos GAGs sulfatados, está associado à presença e à distribuição dos grupos sulfatos ao longo da cadeia polissacarídica (POMIN, 2015). No entanto, outros fatores como o tipo de monossacarídeo, ligação glicosídica, conformação da cadeia polimérica e massa molar também podem influenciar nas atividades biológicas dos GAGs (ROMAN et al., 2017).

Desta forma, foi determinado o grau de substituição por grupo sulfato (DS) das amostras de GAGs totais, F-V e F-VII. O DS nos mostra a quantidade de grupos sulfatos existentes por unidade monomérica. Os resultados de F-V mostraram DS de 0,11 e porcentagem de sulfato de 7,9 %, apesar de serem valores baixos, estes são esperados, tendo em vista que a F-V foi caracterizada como AH, que é o único GAG que não possui

agrupamento sulfato (POMIN, 2015). No entanto, como já era esperado, a amostra de GAGs totais e F-VII apresentaram resultados mais expressivos, sendo seus DS de 1,50 (9,8 % sulfato) e 0,20 (12,8 % sulfato), respectivamente, valores estes que são similares aos relatados em outros estudos, quando há presença de SC e SD (NAKANO; BETTI; PIETRASIK, 2010; PANAGOS et al., 2014b). Os valores para a amostra de GAGs totais, se apresentam menores que a F-VII, possivelmente pela presença interferente do AH, que faz com que amostra não seja constituída apenas por GAGs sulfatados, como na F-VII.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DAS FRAÇÕES DOS GLICOSAMINOGLICANOS DA BARBELA DE PERU

As amostras de GAGs totais, F-V contendo o ácido hialurônico (AH) e F-VII contendo sulfato de condroitina (SC) e sulfato de dermatana (SD) foram investigadas em relação às suas atividades anticoagulante e citotóxica/antiproliferativa.

### 5.8.1 Atividade anticoagulante *in vitro*

As principais doenças causadoras de morte, como doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, podem ser tratados com a administração de anticoagulantes (KRICHEN et al., 2017; SMALLEY, 1993). Os GAGs sulfatados são dotados de altas propriedades anticoagulantes, este fato têm despertado o interesse das indústrias farmacêuticas (BOUGATEF et al., 2019; SAYARI et al., 2018).

Um composto é considerado anticoagulante quando ele demonstra capacidade de manter o sangue fluido, em um tempo superior a 2,5 vezes ao tempo obtido com controle num teste de coagulação como o aPTT (tromboplastina parcial ativada - *activated partial thromboplastin time*) (ANVISA, 2010).

Os resultados do ensaio aPTT estão apresentados na Tabela 8. O ensaio aPTT, nos mostra a eficácia do polissacarídeo na manutenção do fluido sanguíneo por um tempo específico, consequentemente seu potencial anticoagulante.

Os resultados de aPTT mostraram que F-V (AH) (DS 0,11), na menor concentração (2100 µg/mL) foi capaz de manter a fluidez sanguínea por 61,45 s, apenas 2,4 vezes mais que o controle, não sendo considerado como atividade anticoagulante, já que não conseguiu elevar o tempo em 2,5 vezes mais que o tempo observado pelo controle que foi de

(24,8 s). Somente quando as concentrações de F-V foram aumentadas para 2400 e 2700 µg/mL é que houve uma resposta mais efetiva (3,1 e 3,8 vezes mais que o controle, respectivamente). A alta concentração necessária para manter o sangue fluido por esse tempo, pode estar diretamente ligado ao fato dessa molécula apresentar alta concentração de AH e em compensação um baixo DS (0,11), isso mostra a importância dos grupos sulfatos para uma resposta anticoagulante, como já foi relatado em muitos trabalhos. Estudos onde moléculas naturalmente sulfatadas foram dessulfatadas, verificou-se a perda da capacidade anticoagulante da molécula (MOURÃO; PEREIRA, 1999) ou moléculas antes da sulfatação química quando testadas *in vitro*, não tiveram resposta (BARDDAL, et al., 2015).

**Tabela 8** - Atividade anticoagulante *in vitro* das frações de glicosaminoglicanos da barbeta de peru em plasma ovino.

Frações	aPTT	
	µg mL	Média Tempo (s)
<b>Controle (salina)</b>	-	24,80 ± 0,08
<b>GAGs totais</b>	500	86,05 ± 0,3
<b>F-V</b>	2100	61,45 ± 0,83
	2400	78,85 ± 0,6
	2700	95,00 ± 0,3
<b>F-VII</b>	360	66,55 ± 1,6
	720	87,65 ± 0,9
	1080	102,45 ± 1,2

A F-VII (DS 2,0) com apenas 360 µg/mL, aumentou em 2,7 vezes (66,55 s) o tempo de aPTT comparado com o controle. Quando testado nas concentrações de 720 e 1080 µg/mL, esse tempo foi elevado em 3,5 (87,65 s) e 4,1 (102,45 s) vezes. A atividade pode parecer baixa se considerado o alto DS apresentado por essa amostra, contudo não somente a densidade dos grupos sulfatos inseridos na molécula é importante para a atividade anticoagulante, mas a posição que eles se encontram, o tamanho da molécula, a estereoquímica dos constituintes e tipos de ligação glicosídica que os une (POMIN, 2009.) Apesar da dificuldade de se encontrar a relação perfeita, percebe-se o potencial que essa molécula apresenta e que a ela pode-se dar uma finalidade. A F-VII na concentração de 360 µg/mL apresentou alto potencial anticoagulante, demonstrando ser uma molécula promissora no campo da coagulação sanguínea.

O polissacarídeo se torna um potente agente anticoagulante, quando a concentração aplicada no plasma é a menor possível, e o tempo aPTT é o mais prolongado (ROMAN et al., 2017). Resultados similares ao exposto neste trabalho, foram relatados nos estudos em enguia

européia por Sila et al., (2019) e GAGs extraídos das vísceras de pacu e tilápia do Nilo por Nogueira et al., (2019), que observaram um aumento no tempo de aPTT em comparação ao controle, em moléculas de GAGs sulfatados.

### 5.8.2 Inibição da atividade anticoagulante dos glicosaminoglicanos com protamina

A protamina é comumente utilizada para reverter o efeito anticoagulante da heparina em processos hemorrágicos ou após procedimentos cirúrgico, vascular ou cardíaco (HIRSH et al., 2001). Tendo em vista a importância de um agente que seja capaz de inibir o efeito anticoagulante da amostra, foi determinado a atividade anticoagulante das frações F-V; F-VII e GAGs totais na presença de igual concentração de protamina.

Na Tabela 9 está apresentado os resultados da inibição da atividade anticoagulante *in vitro* por protamina sulfato. Os resultados da F-VII foram bem expressivos, pois a presença da protamina no meio, fez com que o tempo de aPTT de F-VII reduzisse em 42%, fazendo com que essa fração perdesse a capacidade de evitar a coagulação do plasma a ponto de se aproximar ao tempo obtido com o controle (26,95 s). Esta evidente resposta demonstra que, além de apresentar potencial anticoagulante, a F-VII pode ter seus efeitos revertidos seguramente pela protamina sulfato, sendo esse seu antídoto.

**Tabela 9** – Inibição da atividade anticoagulante *in vitro* por protamina sulfato

<b>µg mL</b>	<b>Fração</b>	<b>Presença de Salina (segundos)</b>	<b>Presença de Protamina sulfato (segundos)</b>
<b>500</b>	GAGs totais	86,05 ± 3,0	78,60 ± 6,1
<b>360</b>	F-VII	66,55 ± 1,6	28,15 ± 0,9

O resultado apresentado pelos GAGs totais, apresentou uma baixa do aPTT 8%, demonstrando que essa fração não é capaz de evitar a coagulação sanguínea. Os ensaios realizados na F-V não foram conclusivos pois houve muita instabilidade nas respostas podendo haver algum tipo de interferência pelo kit ou pela própria interação entre as moléculas.

### 5.8.3 Atividade citotóxica/antiproliferativa *in vitro*

Na Figura 13 está apresentado os percentuais de viabilidades celulares obtidas para as células de carcinoma hepatocelular humano tratadas com a F-V, obtidas das barbelas de peru.

Os dados mostram que a fração F-V, em diferentes concentrações (1-100 µg/mL), apresentaram efeito citotóxico/antiproliferativa para as células tumorais, pois apresentaram viabilidade celular média estatisticamente menores e diferentes da viabilidade celular do controle negativo, em todos os tempos de avaliação (24, 48 e 72 h). Inclusive, a viabilidade celular foi menor que 87% (24 h), 81% (48 h) e 54% (72 h).

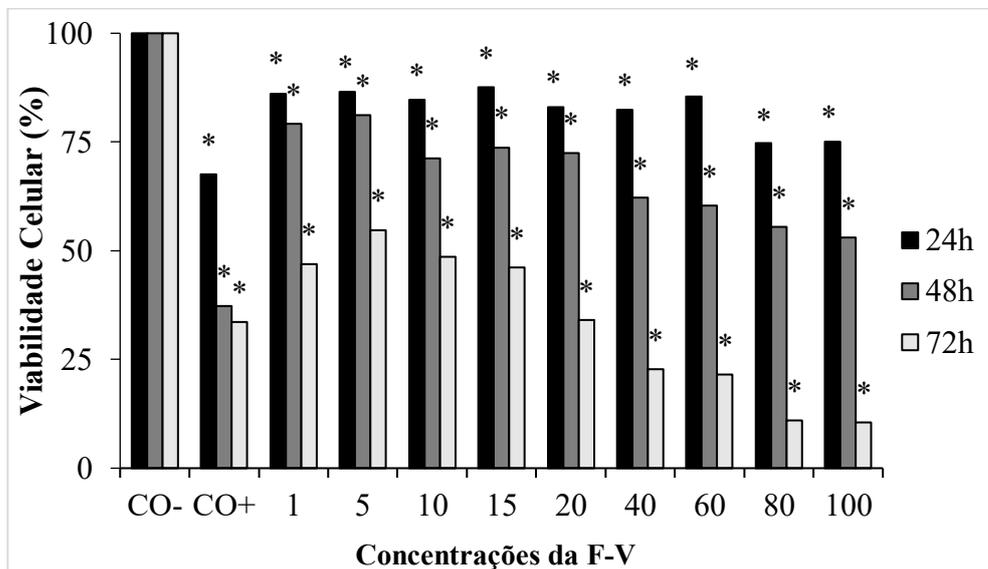
Além disso, pode-se perceber que conforme o aumento da concentração avaliada da F-V e do tempo de exposição, a mortalidade das células tumorais foi maior, chegando a 10,58% de viabilidade celular para a concentração de 100 µg/mL no tempo de 72 h. Esses dados indicam um efeito citotóxico/antiproliferativo da F-V, o qual é influenciado pela concentração e pelo tempo de exposição.

A *American National Cancer Institute*, destaca que caso uma amostra em concentrações abaixo de 30 µg/mL, apresente inibição de 50% das divisões celulares, após 72 h de exposição, o agente pode ser considerado um citotóxico eficaz (LIVINGSTONE, 2001). Sendo assim, a F-V que é composto por ácido hialurônico, apresentou viabilidade celular ainda menor nas concentrações de 20 µg/mL (34%) e 40 µg/mL (22,69%), no tempo de 72 h, comprovando a eficácia do mesmo, como citotóxico/antiproliferativo para o hepatoma humano.

Para as células de adenocarcinoma renal humano (Figura 14), a F-V também apresentou efeito citotóxico, entretanto, menos evidente que o indicado com as células metabolizadoras, sugerindo algum efeito de metabolização na citotoxicidade/antiproliferativa do F-V ou até uma maior sensibilidade das células hepáticas se comparadas às renais.

No tempo de 24 h as concentrações de 1, 5, 10, 80 e 100 µg/mL apresentaram efeito citotóxico para as células tumorais de rim humano. No tempo de 48 h, todas as concentrações apresentaram este efeito e, no tempo de 72 h, as concentrações acima de 10 µg/mL foram citotóxicas. No tempo de 72 h, pôde-se observar um efeito dependente da concentração de F-V avaliada, houve redução da viabilidade celular mediante o aumento da concentração, sendo que a concentração de 100 µg/mL, no tempo de 72 h, atingiu viabilidade celular de 53,54%.

**Figura 13** - Percentual de viabilidade de células tumorais hepáticas humanas (HepG2/C3A) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-V ( $\mu\text{g/mL}$ ), por 24, 48 e 72 h.



\* Resultado estatisticamente significativo se comparado ao controle negativo.

Os resultados de atividade citotóxica/antiproliferativa da F-V justificam-se pelo fato deste modular as vias de sinalização intracelular que controlam processos biológicos, a proliferação celular, a mobilidade e as propriedades invasivas das células malignas, interferindo no crescimento tumoral (GRAÇA et al., 2020; SIRONEN, et al., 2011), como demonstrado no presente estudo.

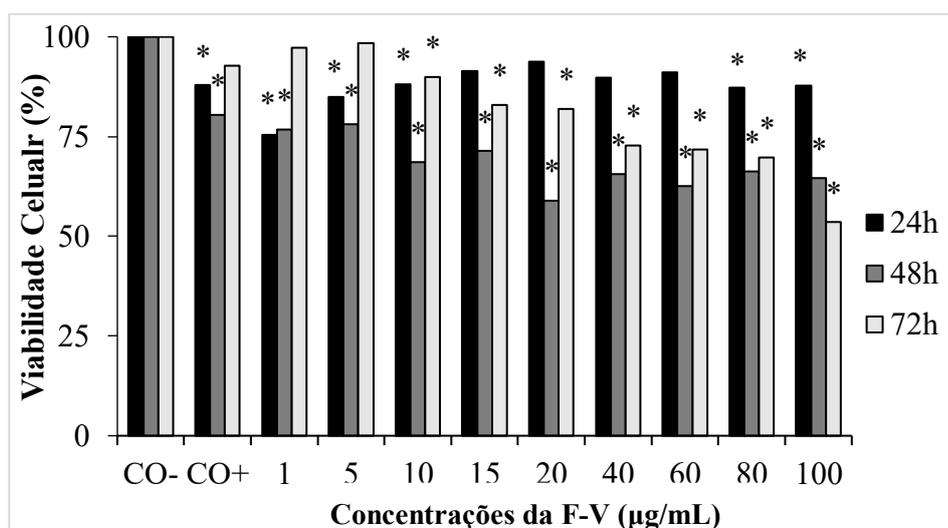
As características do AH fazem dele um material versátil para a construção de vários sistemas de administração de medicamentos (LIU et al., 2016; TIWARI; BAHADUR., 2019). Os complexos de fármacos associados ao AH podem elevar a captação celular e a citotoxicidade *in vitro*, reduzindo o tamanho do tumor e prolongando o tempo de sobrevivência em comparação com medicamentos ausentes de AH (TEMENOFF; MIKOS, 2000).

Na Figura 15 está apresentado os percentuais de viabilidades celulares obtidos para as células de carcinoma hepatocelular humano tratadas com a F-VII, obtidas das barbelas de peru.

Os dados mostram que as concentrações acima de 40  $\mu\text{g/mL}$ , em todos os tempos de avaliação (24, 48 e 72 h), apresentaram efeito citotóxico estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) para as células tumorais em comparação com o controle negativo. Apresentaram viabilidade celular menor que 50% para a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  (24 h) e para as

concentrações de 80 e 100  $\mu\text{g/mL}$  (48 e 72 h). Neste caso, observa-se um efeito citotóxico dependente da concentração nos três tempos de avaliação, com efeito do tempo, somente para as concentrações acima de 60  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 14** – Percentual de viabilidade de células tumorais de rim humano (786-0) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-V ( $\mu\text{g/mL}$ ), por 24, 48 e 72 h.



\* Resultado estatisticamente significativo se comparado ao controle negativo.

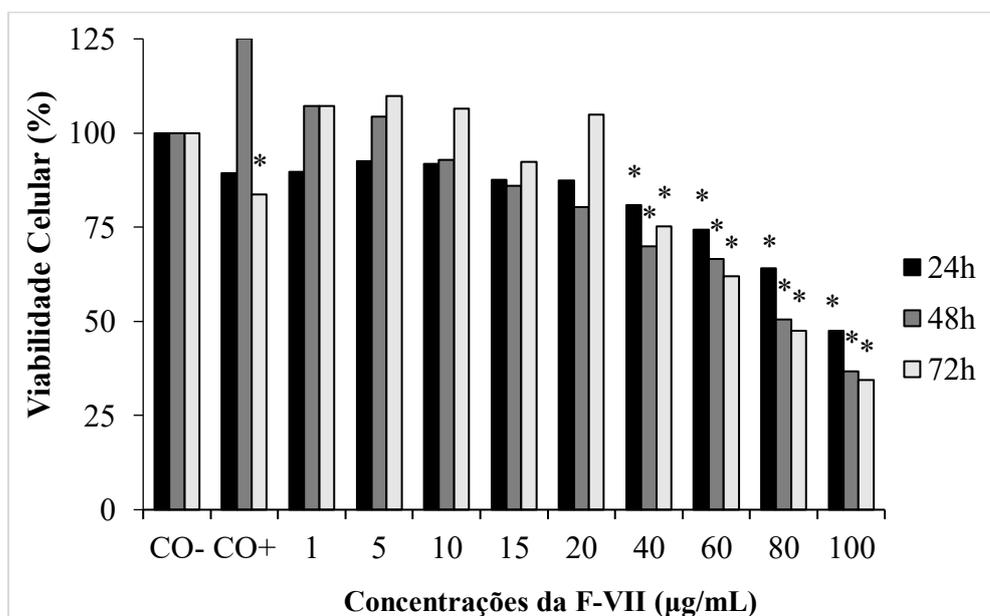
Porém, para o F-VII, o efeito citotóxico foi mais evidente para as células de adenocarcinoma renal humano (Figura 16), onde as concentrações acima de 15  $\mu\text{g/mL}$ , no tempo de 24 h, as diferentes concentrações, no tempo de 48 h, e as concentrações acima de 10  $\mu\text{g/mL}$ , no tempo de 72 h, apresentaram efeito citotóxico. Ocorreu um evidente efeito citotóxico dependente da concentração avaliada, onde as maiores concentrações, em todos os tempos de exposição, apresentaram as menores viabilidades celulares (51,33% - 24 h, 18,10% - 48 h e 14,69% - 72 h).

A concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  nos tempos de 48 e 72 h, apresentaram viabilidades celulares menores que 50 %. Este resultado é similar ao que foi apresentado, para as células metabolizadoras, nas concentrações de 80 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , nos tempos de 48 e 72 h. Ambas necessitaram de uma maior concentração de amostra e um tempo de exposição prolongado, para apresentar viabilidade menor que 50 %.

A fração F-VII é composta de cadeias de sulfato de condroitina 4 e 6 (SC) e sulfato de dermatana (SD). Resultados similares ao encontrado neste estudo, também foram relatados por Krichen et al., (2017a, 2018b), entretanto, em um dos estudos onde os GAGs tinham maior teor de sulfato, o que fez com que o efeito antiproliferativo fosse mais evidente.

Os SCs são conhecidos e amplamente utilizados em fármacos para o tratamento de osteoartrite e dores nas articulações (GRAÇA et al., 2020). A variabilidade na composição do SC/SD pode ser influenciada por sua origem, tornando possível diferenciar os GAGs das fontes terrestres e marinhas (AFRATIS et al., 2012). O número e a posição do agrupamento sulfato de sequências específicas nas cadeias de SC, SD são os principais fatores que podem influenciar as atividades biológicas, pois são fundamentais para a interação com proteínas bioativas, que influenciam os principais processos celulares relacionados à proliferação de células-tronco neurais e hepatocelulares (AFRATIS et al., 2012; POMIN, 2015a).

**Figura 15** - Percentual de viabilidade de células tumorais hepáticas humanas (HepG2/C3A) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-VII ( $\mu\text{g/mL}$ ).

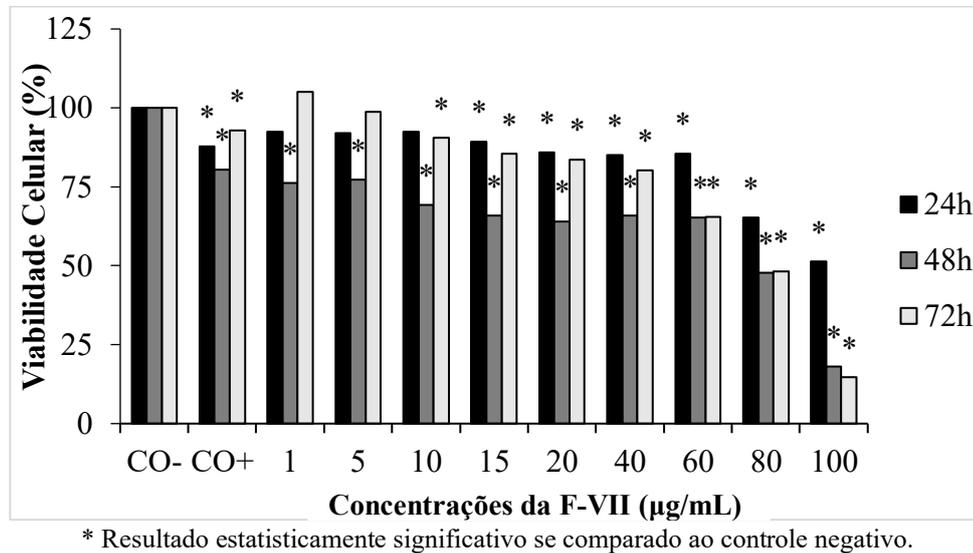


\* Resultado estatisticamente significativo se comparado ao controle negativo.

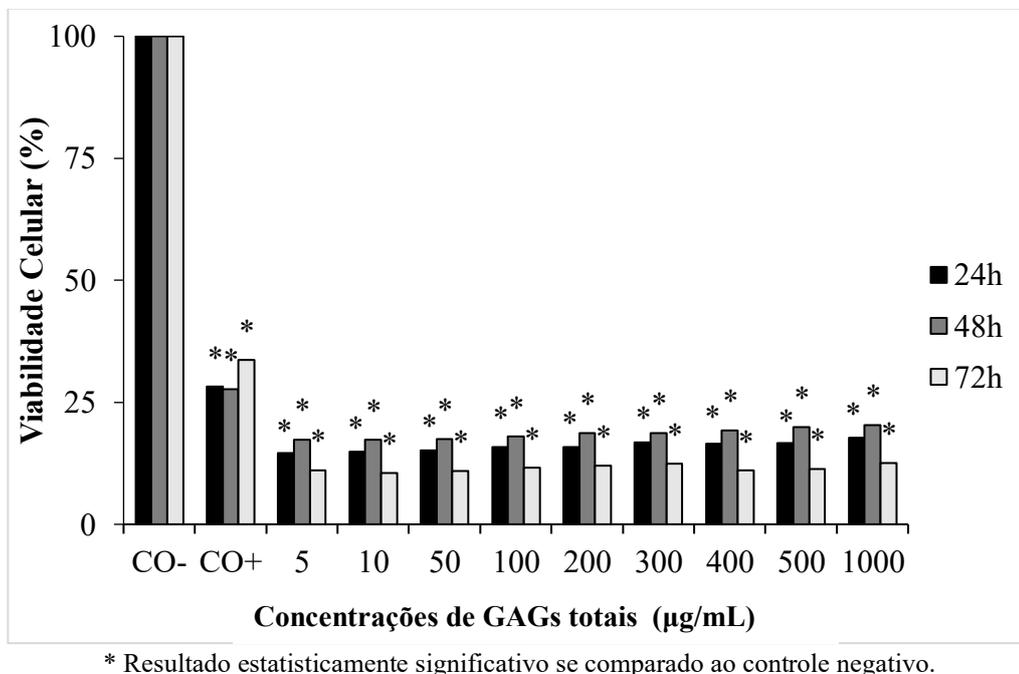
Na Figura 17 está apresentado as viabilidades celulares obtidas para as células de carcinoma hepatocelular humano tratadas com os GAGs totais, extraídos das barbelas de peru.

Os dados mostram que todas as concentrações (5-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram efeito citotóxico para as células tumorais, pois apresentaram viabilidade celular média estatisticamente menores e diferentes da viabilidade celular do controle negativo, em todos os tempos de avaliação. Inclusive, o efeito citotóxico/antiproliferativo foi muito evidente, pois as viabilidades celulares foram menores que 18% (24 h), 21% (48 h) e 13% (72 h), indicando, como mostrado por Boik (2001), a elevada eficácia dos GAGs como citotóxicos/antiproliferativo.

**Figura 16** - Percentual de viabilidade de células tumorais de rim humano (786-0) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações da F-VII ( $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 17** Percentual de viabilidade de células tumorais hepáticas humanas (HepG2/C3A) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações dos GAGs totais ( $\mu\text{g/mL}$ ).



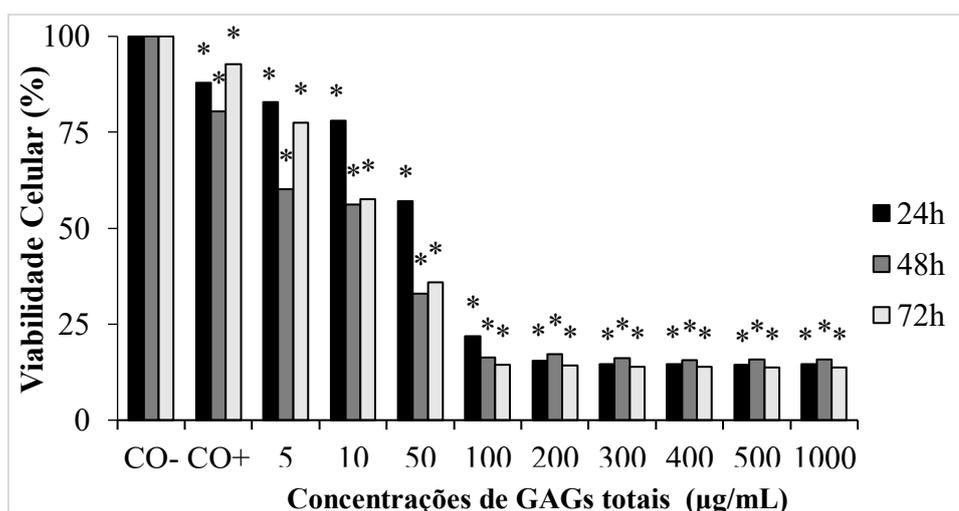
Resultados semelhantes foram obtidos com as células de adenocarcinoma renal humano (Figura 18), já que os dados mostram que todas as concentrações (5-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram efeito citotóxico para essas células tumorais, atingindo viabilidades celulares de

14,49% (500 µg/mL - 24 h), 15,57% (400 µg/mL - 48 h) e 13,69% (500 e 1000 µg/mL - 72 h). Inclusive, as viabilidades celulares foram menores que 50% para as concentrações acima de 100 µg/mL (24 h) e 50 µg/mL (48 e 72 h).

Assim, os resultados do teste de citotoxicidade com as duas linhagens tumorais e os GAGs totais mostram que, possivelmente, devido à mistura de compostos AH/SC-4 e SC-6/DS dessa amostra, estes podem ter atuado com um efeito citotóxico/antiproliferativo sinérgico e, por isso, apresentaram efeito citotóxico ainda mais notável nas células HepG2/C3A e 786-0 do que as frações isoladas F-V e F-VII.

Os resultados do presente estudo estão em acordo com os demonstrados pelos GAGs sulfatados extraídos da casca de lagostim (*Nephrops norvegicus*) que apresentaram efeito citotóxico para as células tumorais, neste caso, testados sobre células do carcinoma do cólon humano (SAYARI et al., 2016). Entretanto, os autores mostraram somente 54,8% de inibição da proliferação celular na concentração de 7,5 mg/mL, inibição inferior à apresentada com as células de hepatoma e adenocarcinoma renal humano e, em concentração maior que a testada com os GAGs totais de barbelas de peru.

**Figura 18** – Percentual de viabilidade células tumorais de rim humano (786-0) tratadas com o controle negativo (CO-) e positivo (CO+) e as diferentes concentrações dos GAGs totais (µg/mL).



\* Resultado estatisticamente significativo se comparado ao controle negativo

A atividade citotóxica/antiproliferativa apresentada no presente estudo identifica uma importante atividade biológica das frações extraídas das barbelas de peru.

O AH é reconhecido por desempenhar um importante papel na formação embrionária, na motilidade celular e está associado à invasividade e metástase do câncer

(KOGAN et al., 2008). Considerando que a proliferação celular foi inibida igualmente por AH de várias massas moleculares de  $3,6 \times 10^6$  a  $5 \times 10^5$  Da (WIIG et al., 1996), o AH purificado da barbeta de peru de alta massa molar (kDa), possui a mesma capacidade que o AH de crista de galo e cordão umbilical humano para inibir a proliferação celular, atuando como um agente tóxico para as células tumorais.

A utilização de polissacarídeos, como os GAGs, para o desenvolvimento de medicamentos anticâncer, podem superar algumas limitações dos atuais medicamentos sintéticos, como a baixa toxicidade por serem de fontes naturais, a facilidade para atravessar as membranas celulares, por se tratar de um carboidrato, além da baixa degradação em fluidos biológicos (SINGH et al., 2019).



## 6 CONCLUSÃO

Os glicosaminoglicanos encontrados na barbela do peru, foram o ácido hialurônico, sulfato de condroitina (SC-6 e SC-4) e sulfato de dermatana. O ácido hialurônico presente é de alta massa molar, com potencial para aplicação nas áreas médicas e farmacêuticas. Com base nos resultados obtidos neste estudo, o efeito citotóxico/antiproliferativo das F-V e F-VII, apresentaram comportamentos distintos para cada célula, no entanto os GAGs totais exibiu um potencial antiproliferativo mais evidente, que as frações. A fração contendo ácido hialurônico (F-V), demonstrou um melhor efeito para células tumorais de hepatoma humano com 10,58% de viabilidade celular para a concentração de 100 µg/mL no tempo de 72 h e para adenocarcinoma renal humano, na mesma concentração e tempo (100 µg/mL, 72 h), a viabilidade celular máxima atingida foi de 53,54%.

A fração composta por glicosaminoglicanos sulfato de condroitina (SC-6 e SC-4) e sulfato de dermatana (F-VII), demonstrou maior toxicidade para a célula tumoral adenocarcinoma renal humano, na concentração 100 µg/mL a viabilidade celular em todos os tempos (51,33% - 24 h, 18,10% - 48 h e 14,69% - 72 h). Para as células tumorais de hepatoma humano, viabilidades celulares menores que 50% foram alcançadas somente para a concentração de 100 µg/mL, nos tempos de 48 e 72h.

Os GAGs totais demonstraram um efeito citotóxico/antiproliferativo altamente tóxico, para ambas as células tumorais. O efeito citotóxico/antiproliferativo foi muito evidente para hepatoma humano, com viabilidades celulares menores que 18% (24 h), 21% (48 h) e 13% (72 h) em todas as concentrações (5-1000 µg/mL). Resultados semelhantes foram obtidos com as células de adenocarcinoma renal humano, em todas as concentrações, atingindo viabilidades celulares de 14,49% (500 µg/mL - 24 h), 15,57% (400 µg/mL - 48 h) e 13,69% (500 e 1000 µg/mL - 72 h). Os GAGs totais apresentaram um efeito sinérgico exibindo um potencial citotóxico/antiproliferativo mais evidente que as frações isoladas F-V e F-VII.

Com relação a atividade anticoagulante *in vitro*, somente a F-VII mostrou potencial anticoagulante. Os resultados alcançados neste estudo, demonstraram que a barbela um subproduto da industrialização do peru, de baixo valor econômico, é uma nova fonte de ácido hialurônico, polissacarídeos de alto valor agregado, e que pode ser amplamente aplicado nas áreas médicas, farmacêuticas e estética. Os glicosaminoglicanos encontrados nas barbelas de

peru possuem um importante potencial biológico para serem utilizadas como, compostos antiproliferativos de fontes naturais.

## 6 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Conforme os resultados obtidos durante este estudo e com a intenção de abrir perspectivas para ampliar o conhecimento científico, sugere-se para novos trabalhos, alguns temas.

- ✓ A extração de ácido hialurônico da barbeta do peru utilizando a enzima hialuronidase.
- ✓ Estudo das atividades citotóxica/antiproliferativa em outras células *in vitro* e testes *in vivo*.
- ✓ Desenvolvimento de *scaffolds* com a aplicação do ácido hialurônico da barbeta do peru e avaliação das propriedades biológicas.
- ✓ Investigação dos glicosaminoglicanos em outros subprodutos de peru, como cabeças e vísceras.



## ANEXOS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP  
DIRETORIA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA - DIT



Avenida Itália km 8, Bairro Caminhos, Rio Grande - RS - CEP: 96208-900 - Fone: 3233.6820  
Fax: 3233.6822 E-mail: dit@furg.br Homepage: <http://www.propesp.furg.br>

## Declaração

Declaro para os devidos fins que **Evellin Balbinot-Alfaro**, inscrita no CPF sob o n.º 054.924.959-17, é uma das inventoras do objeto do pedido de patente n.º **BR 10 2020 009691 5**, de titularidade da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI em 14/05/2020, o qual se encontra em período de sigilo.

Rio Grande, 07 de outubro de 2020.

Prof. Dr. Luciano Maciel Ribeiro  
Diretor de Inovação Tecnológica em exercício



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. M.; FERNÁNDEZ, N.; MATIAS, A. A.; BRONZE, R. Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources : Extraction and purification methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 243, n. April, p. 116441, 2020.

ABPA. Annual Report of the Brazilian Association of Animal Protein. **Relatório anual 2018**, p. 176, 2018.

AFRATIS, N.; GIALELI, C.; NIKITOVIC, D.; TSEGENIDIS, T.; KAROUSOU, E.; THEOCHARIS, A. D.; PAVÃO, M. S.; TZANAKAKIS, G. N.; KARAMANOS, N. K. Glycosaminoglycans: Key players in cancer cell biology and treatment. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1177–1197, 2012.

AISA, Y.; MIYAKAWA, Y.; NAKAZATO, T.; SHIBATA, H.; SAITO, K.; IKEDA, Y.; KIZAKIET, M. Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. **American Journal of Hematology**, v. 78, p. 7–14, 2005.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, W. P. **Biologia Molecular das Células**. Artmed ed. 5.

ALVES, S. A. de O.; DE CAMPOS, B.; RIEGEL-VIDOTTI, I. C.; URBANO, A.; CRISTINA, P.; FARIA-TISCHER, D. S.; AUGUSTO, C. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 642–653, 2017.

AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Cheese whey: A cost-effective alternative for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. **Food Chemistry**, v. 198, p. 54–61, 2016.

AMADO, I. R.; VÁZQUEZ, J. A.; PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J. A. Microbial production of hyaluronic acid from agro-industrial by-products : Molasses and corn steep liquor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 181–187, 2017.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**, 2010. Ed. 5.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 19th. ed.

ARMSTRONG, D. C.; COONEY, M. J.; JOHNS, M. R. Growth and amino acid requirements of hyaluronic acid producing *Streptococcus zooepidemicus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 309–312, 1997.

BARATTI, M.; AMMANNATI, M.; MAGNELLI, C.; MASSOLO, A.; DESSÌ-FULGHERI, F. Are large wattles related to particular MHC genotypes in the male pheasant. **Genetica**, v. 138, n. 6, p. 657–665, 2010.

BARDDAL, H. P.; GRACHER, A. H. P.; SIMAS-TOSIN, F. F.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Anticoagulant activity of native and partially degraded glycolglucuronomannan after

chemical sulfation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 328–333, 2015.

BARDDAL, H. P. O.; ARIA, F. A. M.; NOGUEIRA, A. V.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 604–610, 2020.

BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 330–334, 1962.

BOAS, N. F. Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb. **Journal of Biological Chemistry**, v. 181, p. 573–575, 1949.

BONNAFFÉ, D. Bioactive synthetic heparan sulfate and heparin derivatives: From long fragments mimetics to chimeras. **Comptes Rendus Chimie**, v. 14, n. 1, p. 59–73, 2011.

BORSCHIVER, S.; VASCONCELOS, R. C.; SILVA, F. C.; FREITAS, G. C.; SANTOS, P. E. On the Map Technology roadmap for hyaluronic acid and its derivatives market. **Biofuels bioproducts & biorefining**, p. 1–10, 2018.

BOUGATEF, A.H.; KRICHEN, F.; CAPITANI, F.; AMOR, I.B; MACCARI, F.; MANTOVANI, V.; GALEOTTI, F.; VOLPI, N.; SILA, A. Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate from Corb (*Sciaena umbra*) Skin: Purification, Structural Analysis and Anticoagulant Effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 131–139, 2020.

BOUGATEF, H.; KRICHEN, F.; CAPITANI, F.; AMOR, I. Ben; GARGOURI, J.; MACCARI, F.; MANTOVANI, V.; GALEOTTI, F.; SILA, A. Purification, compositional analysis, and anticoagulant capacity of chondroitin sulfate/dermatan sulfate from bone of corb (*Sciaena umbra*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 405–412, 2019.

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

CATERSON, B.; MELROSE, J. Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. **Glycobiology**, v. 28, n. 4, p. 182–206, 2018.

CIPRIANI, T. R. ; GRACHER, A. H. P.; SOUZA, L. M.; FONSECA, R. J. C.; BELMIRO, C. L. R.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Influence of molecular weight of chemically sulfated citrus pectin fractions on their antithrombotic and bleeding effects. **Thrombosis Haemostasis**, v. 101, p. 860–896, 2009.

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

DIETRICH, C.P.; MCDUFFIE, N.M.; SAMPAIO, L.O. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 130, n. 11, p. 299–304, 1977.

DE PASQUALE, V.; PAVONE, L. M. Heparan sulfate proteoglycans: The sweet side of development turns sour in mucopolysaccharidoses. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 11, p. 165539, 2019.

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

DU, L.; KHIARI, Z.; PIETRASIK, Z.; BETTI, M. Physicochemical and functional properties of gelatins extracted from turkey and chicken heads. **Poultry Science**, v. 92, n. 9, p. 2463–2474, 2013.

DU, L.; KEPLOVÁ, L.; KHIARI, Z.; BETTI, M. Preparation and characterization of gelatin from collagen biomass obtained through a pH-shifting process of mechanically separated turkey meat. **Poultry Science**, v. 93, n. 4, p. 989–1000, 2014.

EGEA, J.; GARCÍA, A. G.; VERGES, J.; MONTELL, E.; LÓPEZ, M. G. Antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. SUPPL. 1, p. S24–S27, 2010.

FALLACARA, A.; BALDINI, E.; MANFREDINI, S.; VERTUANI, S. Hyaluronic acid in the third millennium. **Polymers**, v. 10, n. 7, 2018.

FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D.; BARRETT, A. J. Farndale. **Biochemistry et Biophysica Acta**, v. 833, n. 2, p. 173–177, 1986.

FAURE, E.; FALENTIN-DAUDRÉ, C.; JÉRÔME, C.; LYSKAWA, J.; FOURNIER, D.; WOISEL, P.; DETREMBLEUR, C. Catechols as versatile platforms in polymer chemistry. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 1, p. 236–270, 2013.

GAO, C.; FUJINAWA, R.; YOSHIDA, T.; UENO, M.; OTA, F.; KIZUKA, Y.; HIRAYAMA, T.; KOREKANE, H.; TANIGUCHI, N. A keratan sulfate disaccharide prevents inflammation and the progression of emphysema in murine models. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 2, p. L268–L276, 2016.

GAVVA, C.; PATEL, K.; KUDRE, T.; SHARAN, K.; CHILKUNDA, D. N. Glycosaminoglycans from fresh water fish processing discard - Isolation, structural characterization, and osteogenic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 558–567, 2020.

GRAÇA, M. F. P.; MIGUEL, S. P.; CABRAL, C. S. D.; CORREIA, I. J. Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, 2020.

GRØNLIEN, K. G.; PEDERSEN, M. E.; B, K. W. S.; B, V. H.; KARLSEN, J.; A, H. H. T. Collagen from Turkey (*Meleagris gallopavo*) tendon: A promising sustainable biomaterial for pharmaceutical use. **Sustainable chemistry and pharmacy**, v. 13, p. 100–166, 2019.

GULBERTI, S.; MAO, X.; BUI, C.; FOURNEL-GIGLEUX, S. The role of heparan sulfate maturation in cancer: A focus on the 3O-sulfation and the enigmatic 3O-sulfotransferases (HS3STs). **Seminars in Cancer Biology**, v. 62, p. 68–85, 2020.

HEMSHEKHAR, M.; THUSHARA, R. M.; CHANDRANAYAKA, S.; SHERMAN, L. S.; KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. **Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine.** Elsevier B.V., 2016. v. 86

HIGASHI, K.; TAKEUCHI, Y.; MUKUNO, A.; TOMITORI, H.; MIYA, M. Composition of Glycosaminoglycans in Elasmobranchs including Several Deep-Sea Sharks : Identification of Chondroitin / Dermatan Sulfate from the Dried Fins of *Isurus oxyrinchus* and *Prionace glauca*. **Plos one**, p. 1–15, 2015.

HIRSH, J.; ANAND, S. S.; HALPERIN, J.L.; FUSTER, V. Guide to anticoagulant therapy, Heparin: a statement for healthcare professional from the American Heart Association. **Circulation**, v. 103, p. 2994–3018, 2001.

HUCKERBY, T. N.; LAUDER, R. M.; BROWN, G. M.; NIEDUSZYNSKI, I. A.; ANDERSON, K.; BOOCOCK, J.; SANDALL, P. L.; WEEKS, S. D. Characterization of oligosaccharides from the chondroitin sulfates C-NMR studies of reduced disaccharides and tetrasaccharides. **European Journal of Biochemistry**, v. 1189, p. 1181–1189, 2001.

HUSSAIN, Z.; THU, H. E.; KATAS, H.; NASIR, S.; BUKHARI, A. Hyaluronic Acid-Based Biomaterials : A Versatile and Smart Approach to Tissue Regeneration and Treating Traumatic , Surgical , and Chronic Wounds. **Polymer Reviews ISSN:**, v. 57, p. 594–630, 2017.

JIAO, L.; X. LI, T.; LI, P.; JIANG, L.; ZHANG, M.; ZHANG, L. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. **international Immunopharmacol**, v. 9, p. 324–329, 2009.

KACZMAREK, B.; SIONKOWSKA, A.; ŁUKOWICZ, K.; MARIA, A. The cells viability study on the composites of chitosan and collagen with glycosaminoglycans isolated from fish skin. **Materials Letters**, v. 206, p. 166–168, 2017.

KANCHANA, S.; ARUMUGAM, M.; GIJI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amussium pleuronectes* (*Linnaeus, 1758*). **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2013.

KARIMZADEH, K. Antihypertensive and anticoagulant properties of glycosaminoglycans extracted from the sturgeon (*Acipenser persicus*) cartilage. **Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences Formerly**, v. 31, n. 4, p. 163–169, 2018.

KHANMOHAMMADI, M.; KHOSHFETRAT, A. B.; ESKANDARNEZHAD, S.; SANI, N. F.; EBRAHIMI, S. Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 4371–4376, 2014a.

KHANMOHAMMADI, M.; KHOSHFETRAT, A. B.; ESKANDARNEZHAD, S.; SANI, N. EBRAHIMI, S. Sequential optimization strategy for hyaluronic acid extraction from eggshell and its partial characterization. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, . 9, p.

2367–2372, 2014b.

KHIARI, Z.; NDAGIJIMANA, M.; BETTI, M. Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. **Poultry Science**, v. 93, n. 9, p. 2347–2362, 2014.

KIM, J. H.; YANG, H.; PARK, J.; BOONS, G. J. A general strategy for stereoselective glycosylations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 34, p. 12090–12097, 2005.

KIM, J.; CHANG, J.; KIM, Y.; KIM, M.; KHO, H. Archives of Oral Biology Effects of molecular weight of hyaluronic acid on its viscosity and enzymatic activities of lysozyme and peroxidase. **Archives of Oral Biology**, v. 89, n. August 2017, p. 55–64, 2018.

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

KOGAN, G.; SOLTES, L.; STERN, R.; SCHILLER, N.; MENDICHI, R. Hyaluronic acid: its function and degradation in in vivo systems. In: **Studies in Natural Products Chemistry**, p. 796.

KRICHEN, F.; GHLISSI, Z.; BEN, I.; SAYARI, N.; KALLEL, R.; GARGOURI, J.; SAHNOUN, Z.; BOUDAWARA, T.; BOUGATEF, A. Experimental and Toxicologic Pathology In vitro and in vivo anti-coagulant activity and toxicological studies of marine sulfated glycosaminoglycans. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, n. 1, p. 45–53, 2017a.

KRICHEN, F.; VOLPI, N.; SILA, A.; MACCARI, F.; MANTOVANI, V.; GALEOTTI, F.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; BOUGATEF, A. Structural characterization and antiproliferative properties of chondroitin sulfate / dermatan sulfate from tunisian fish skins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 32–39, 2017b.

KRICHEN, F.; GHLISSI, Z.; ABDALLAH, R. Ben; KALLEL, R.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; CARMEN GÓMEZ-GUILLÉN, M.; SILA, A.; BOUDAWARA, T.; BOUGATEF, A. Glycosaminoglycans from grey triggerfish and smooth hound skins: Rheological, Anti-inflammatory and wound healing properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 965–975, 2018a.

KUBASKI, F.; OSAGO, H.; MASON, R. W.; YAMAGUCHI, S.; KOBAYASHI, H.; TSUCHIYA, M.; ORII, T.; TOMATSU, S. Glycosaminoglycans detection methods : Applications of mass spectrometry. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 120, n. 1–2, p. 67–77, 2017.

LEE, J. J.; TICAR, B. F.; ROHMAH, Z.; PARK, S. H.; KANG, D.; KANG, S. J.; CHOI, B. D. Skin regeneration effect of the Glycosaminoglycans from *Liparis tessellatus* eggs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1369–1374, 2017.

LI HUI CHEN; FENG, J.; YONG, Z.; SHUHAI DI, M.; EI, H.; HUSSAIN, Z. Hyaluronic acid an efficient biomacromolecule for treatment of inflammatory skin and joint diseases : A review of recent developments and critical appraisal of preclinical and clinical investigation.

**International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 572–584, 2018.

LI, Q.; LI, G.; ZHAO, X.; SHAN, X.; CAI, C.; ZHAO, J.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; YU, G. Structural characterization and interaction with RCA120 of a highly sulfated keratan sulfate from blue shark (*Prionace glauca*) cartilage. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 1–15, 2018.

LIMA, R. A. . **Crescimento da produção brasileira de peru**. Disponível em: <[http://www.sna.agr.br/uploads/AnimalBusiness\\_16\\_10.pdf](http://www.sna.agr.br/uploads/AnimalBusiness_16_10.pdf)>. Acesso em 15 de maio de 2020.

LINDAHL, U.; KJELLÉN, L. Heparin or Heparan Sulfate-What is the difference? **Thrombosis and haemostasis**, v. 65, n. 1, p. 044–048, 1991.

LINHARDT, R. J.; HILEMAN, R. E. Dermatan sulfate as a potential therapeutic agent. **General Pharmacology**, v. 26, n. 3, p. 443–451, 1995.

LIU, J.; ZHOU, L.; HE, Z.; GAO, N.; SHANG, F.; XU, J.; LI, Z. Structural analysis and biological activity of a highly regular glycosaminoglycan from *Achatina fulica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 433–441, 2018a.

LIU, L.; GAO, Q.; LU, X.; ZHOU., H. In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 6, p. 673–683, 2016.

LIU, Y.-C.; LIU, S.-Y.; WANG, N. Fully-tuned fuzzy neural network based robust adaptive tracking control of unmanned underwater vehicle with thruster dynamics. **Neurocomputing**, v. 196, p. 1–13, 2016.

LIVINGSTONE, J. **Natural compounds in cancer therapy**. v. 15, 2001.

LORI-ANN, L.; WARKENTIN, T. E. Heparin-induced thrombocytopenia: real-world issues. In: Seminars in thrombosis and hemostasis. **Thieme Medical Publishers**, p. 653–663, 2011.

MACCARI, F.; FERRARINI, F.; VOLPI, N. Structural characterization of chondroitin sulfate from sturgeon bone. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 11, p. 1575–1580, 2010.

MAHMOUD H. ABU ELELLA, RIHAM R. MOHAMED, M. W. S. Synthesis of novel grafted hyaluronic acid with antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 18, p. 2–31, 2018.

MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; HASHIMOTO, M.; NAKANO, T. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida*. **in vivo**, v. 17, p. 245–249, 2003.

MENDE, M.; BEDNAREK, C.; WAWRYSZYN, M.; SAUTER, P.; BISKUP, M. B.; SCHEPERS, U.; BRÄSE, S. Chemical Synthesis of Glycosaminoglycans. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 14, p. 8193–8255, 2016.

MEYER, K.; LINKER, A.; DAVIDSON, A. E.; WEISSMANN, B. The mucopolysaccharides of bovine cornea. **Mucopolysaccharides**, v. 2, n. 23, p. 3805–3809, 1953.

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

MOURA, H. C.; NOVELLO, C.; ALFARO, A. T.; BARDDAL, H. P. O.; BALBINOT-ALFARO, E.; DUSMAN, E. Characteristics and applications of glycosaminoglycans: use of by-products of the food industry DOI:10.34115/basrv4n3-053. **Brazilian Applied Science Review** **1422**, v. 4, n. 3, p. 1421–1436, 2020.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 225–232, 1999.

NAKANO, T.; BETTI, M.; PIETRASIK, Z. Extraction , Isolation and Analysis of Chondroitin Sulfate Glycosamino- glycans. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 2, p. 61–74, 2010.

NAKANO, T.; SIM, J. S. Research Note: Glycosaminoglycans from the Rooster Comb and Wattle T. **Poultry Science** **68:1303-1306**, v. 5, p. 1303–1306, 1988.

NAKANO, T.; SIM, J. S. PHYSIOLOGY AND REPRODUCTION Chemical Composition of Glycosaminoglycan Fractions from the Comb and Wattle of Single Comb White Leghorn Roosters. **Physiology and reproduction chemical**, p. 2524–2528, 1991.

NELSON, DAVID L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed ed. 2014.

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

OKAMOTO, Y.; HIGASHI, K.; LINHARDT, R. J.; TOIDA, T. Comprehensive analysis of glycosaminoglycans from the edible shell fish. **Carbohydrate Polymers**, v. 184, n. October 2017, p. 269–276, 2018.

OLSON, S. T.; BJORK, I.; SHEFFER, R.; CRAIG, P. A.; SHORE, J. D.; CHOAY, J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 18, p. 12528–12538, 1992.

ORYAN, A.; KAMALI, A.; MOSHIRI, A.; BAHARVAND, H.; DAEMI, H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, n. PartA, p. 678–688, 2018.

PALMER, K. M. and J. W. ARTICLE : The polysaccharide of the vitreous humor Karl Meyer and John W . Palmer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 107, p. 629–634, 1934.

PANAGOS, C. G.; THOMSON, D.; MOSS, C.; BAVINGTON, C. D.; ÓLAFSSON, H. G.

Characterisation of hyaluronic acid and chondroitin / dermatan sulfate from the lumpsucker fish , *C. lumpus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 106, p. 25–33, 2014a.

PANAGOS, C.; THOMSON, D.; BAVINGTON, C. D. Structural characterisation of oligosaccharides obtained by Fenton-type radical depolymerisation of dermatan sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2086–2092, 2012.

PAPAKONSTANTINOY, E.; ROTH, M.; KARAKIULAKIS, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, 2012.

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

POMIN, V. H. An overview about the structure–function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, p. 601–609, 2009.

POMIN, V. H. A Dilemma in the Glycosaminoglycan-Based Therapy : Synthetic or Naturally Unique Molecules ? **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 6, p. 1195–1219, 2015a.

POMIN, V. H. NMR structural determination of unique invertebrate glycosaminoglycans endowed with medical properties. **Carbohydrate Research**, v. 413, p. 41–50, 2015b.

PRICE, K. S.; DODGSON, R. G. A Note on the Determination of the Ester Sulphate Content of Sulphated Polysaccharides. **Journal biochemistry**, v. 84, p. 106–110, 1962.

SMALLEY, J. W. **Correlation tables for infrared spectran: Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds**. [s.l.] University of Salford, Pergamon Press, 1993.

RANI, A.; BARUAH, R.; GOYAL, A. Physicochemical , antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 11–19, 2017.

RESTAINO, R. F.; FINAMORE, R.; PAOLA DIANA; MARSEGLIA, M.; VITIELLO, M.; CASILLO, A.; BEDINI, E.; PARRILLI, M.; SCHIRALDI, C. M. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate Odile. **Analytica Chimica Acta**, v. 16, n. 2017, p. 4–32, 2016.

SADHASIVAM, G.; MUTHUVEL, A.; PACHAIYAPPAN, A.; THANGAVEL, B. Isolation and characterization of hyaluronic acid from the liver of marine stingray *Aetobatus narinari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 84–89, 2013a.

SAFDAR, M. H.; HUSSAIN, Z.; ABOUREHAB, M. A. S.; HASAN, H.; AFZAL, S.; THU, H. E.; HASSAN, M.; HUSSAIN, Z.; ABOUREHAB, M. A. S. New developments and clinical transition of hyaluronic acid-based nanotherapeutics for treatment of cancer : reversing multidrug resistance , tumour-specific targetability and improved anticancer efficacy. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2017.

SANTOS, I. **Produção de Perus: A avicultura além de frango e ovos**. Disponível em:

◇. Acesso em: 25 de maio de 2018.

SAYARI, N.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; BEN MANSOUR, M.; SILA, A.; MOKNI, A.; BESBES, S.; BOUGATEF, A.; BALTI, R. Structural characteristics and biological activities of sulfated glycosaminoglycans extracted from shrimp by-products. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1–11, 2018.

SAYARI, N.; BALTI, R.; BEN MANSOUR, M.; BEN AMOR, I.; GRAIET, I.; GARGOURI, J.; BOUGATEF, A. Anticoagulant properties and cytotoxic effect against HCT116 human colon cell line of sulfated glycosaminoglycans isolated from the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) shell. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 80, p. 322–330, 2016.

SCHANTÉ, C. E.; ZUBER, G.; HERLIN, C.; VANDAMME, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 469–489, 2011.

SCHOEN, P.; WIELDERS, S.; PETITOU, M.; LINDHOUT, T. The effect of sulfation on the anticoagulant and antithrombin III-binding properties of a heparin fraction with low affinity for antithrombin III. **Trombosis Research**, v. 57, p. 415–423, 1990.

SEVERO, D. R. C.; HOELZELII, S. C.; VIERAII, V. B.; BARRETO, P. M.; BEIRÃO, L. H. Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2593–2598, 2008.

SHI, Y., M.; Y., LI, J., C.; J., LIU, Y.; BAI, X. Chondroitin sulfate: Extraction, purification, microbial and chemical synthesis. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 10, p. 1445–1465, 2014.

SHIRATO, K.; GAO, C.; OTA, F.; ANGATA, T.; SHOGOMORI, H.; OHTSUBO, K.; YOSHIDA, K.; LEPENIES, B.; TANIGUCHI, N. Flagellin/Toll-like receptor 5 response was specifically attenuated by keratan sulfate disaccharide via decreased EGFR phosphorylation in normal human bronchial epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 435, n. 3, p. 460–465, 2013.

SILA, A.; BOUGATEF, H.; CAPITANI, F.; KRICHEN, F.; MANTOVANI, V.; BEN, I.; GALEOTTI, F.; MACCARI, F.; BOUGATEF, A. Studies on European eel skin sulfated glycosaminoglycans : Recovery , structural characterization and anticoagulant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 891–899, 2018.

SINGH, A. K.; BHADAURIA, A. S.; KUMAR, P.; BERA, H.; SAHA, S. **Bioactive and drug-delivery potentials of polysaccharides and their derivatives**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2019.

SIRONEN, R. K.; TAMMI, M.; TAMMI, R.; AUVINEN, P. K.; ANTTILA, M.; KOSMA, V. Hyaluronan in human malignancies. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 4, p. 383–391, 2011.

SOLAKYILDIRIM, K. Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 3731–3741, 2019.

SOMMARIN, Y.; WENDEL, M.; SHEN, Z.; HELLMAN, U.; HEINEGÅRD, D.

Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 27, p. 16723–16729, 1998.

SONG, J. M.; IM, J. H.; KANG, J. H.; KANG, D. J. A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 3, p. 633–634, 2009.

SUZUKI, M. Biochemical studies on carbohydrates. I prosthetic group of cornea mucoid. **journal Biochemistry**, v. 30, p. 185–191, 1939.

SWANN, D. A. Studies on hyaluronic acid I. The preparation and properties of rooster comb. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1, n. 1968, p. 17–30, 1967.

TAVIANATOU, A. G.; CAON, I.; FRANCHI, M.; PIPERIGKOU, Z.; GALESSO, D. Hyaluronan : molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. **The FEBS Journal** 286, v. 286, p. 2883–2908, 2019.

TEMENOFF, J. S.; MIKOS., A. G. engineering for regeneration of articular cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 5, p. 431–440, 2000.

TEXIDÓ, R.; ORGAZ, A.; RAMOS-PÉREZ, V.; BORRÓS, S. Stretchable conductive polypyrrole films modified with dopaminated hyaluronic acid. **Materials Science and Engineering C**, v. 76, p. 295–300, 2017.

TIWARI, S.; P. BAHADUR. Modified hyaluronic acid-based materials for biomedical applications,. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 556–571, 2019.

TOFFANIN, R.; KVAM, B. J.; FLAIBANI, A.; ATZORI, M.; BIVIANO, F.; PAOLETTI, S. NMR studies of oligosaccharides derived from hyaluronate: complete assignment of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of aqueous di- and tetra-saccharides, and comparison of chemical shifts for oligosaccharides of increasing degree of polymerisation. **Carbohydrate Research**, v. 245, n. 1, p. 113–120, 1993.

TOIDA, T.; TOYODA, H.; IMANARI, T. High-Resolution Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies on Chondroitin Sulfates. **Analytical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 53–58, 1993.

TÓTH, G.; VÉKEY, K.; SUGÁR, S.; KOVALSZKY, I.; DRAHOS, L.; TURIÁK, L. Salt gradient chromatographic separation of chondroitin sulfate disaccharides. **Journal of Chromatography A**, v. 1619, p. 2–7, 2020.

TSAI, C. T.; ZULUETA, M. M. L.; HUNG, S. C. Synthetic heparin and heparan sulfate: probes in defining biological functions. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 40, p. 152–159, 2017.

VALCARCEL, J.; NOVOA-CARBALLAL, R.; PÉREZ-MARTÍN, R. I.; REIS, R. L.; ANTONIO, J. Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 6, p. 711–725, 2017.

VISKOV, C.; ELLI, E. ; URSO, E.; GAUDES, D.; MOURIER, P. HERMAN, F. ; BOUDIER, C.; CASU, B.; TORRI, G.; GUERRINI, M. Heparin dodecasaccharide containing two antithrombin-binding pentasaccharides: Structural features and biological properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 36, p. 25895–25907, 2013.

VOLPI, N. Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixtures by sequential precipitation with various organic solvents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 685, p. 27–34, 1996.

VOLPI, N. Dermatan sulfate : Recent structural and activity data. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 233–239, 2010.

VOLPI, N.; MACCARI, F. Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis*. **Biochimie**, v. 85, n. 6, p. 619–625, 2003.

VOLPI, N.; MACCARI, F.; TITZE, J. Simultaneous detection of submicrogram quantities of hyaluronic acid and dermatan sulfate on agarose-gel by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 820, n. 1, p. 131–135, 2005.

VOLPIN. Fractionation of Heparin, Dermatan Sulfate, and Chondroitin Sulfate by Sequential Precipitation: A Method to Purify a Single Glycosaminoglycan Species from a Mixture. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 2, p. 382–391, 1994.

WANG, H.; BETTI, M. Sulfated glycosaminoglycan-derived oligosaccharides produced from chicken connective tissue promote iron uptake in a human intestinal. **Food Chemistry**, v. 220, p. 460–469, 2017.

WANG, L.; DI, L.; WU, H. Acta Histochemica Abundance of saccharides and scarcity of glycosaminoglycans in the soft tissue of clam , *Meretrix meretrix* (*Linnaeus*). **Acta Histochemica**, v. 120, n. 6, p. 551–557, 2018.

WERNECK, C. C.; CRUZ, M. S.; SILVA, L. F.; SAVINO, W.; MOURA, P. A. S. Is There a Glycosaminoglycan-Related Heterogeneity of the Thymic Epithelium ? v. 79, n. October 1999, p. 68–79, 2000.

WIIG, M.; ABRAHAMSSON, S.-O.; LUNDBORG, G.; MAIME, S. Effects of Hyaluronan on Cell Proliferation and Collagen Synthesis: A Study of Rabbit Flexor Tendons In Vitro. **The Journal of Hand Surgery**, v. 21, n. 4, p. 559–604, 1996.

WOLFROM, R. L. W. J. N. B. M. L. **Methods in carbohydrate chemistry**. 1962.

XU, D.; ARNOLD, K.; LIU, J. Using structurally defined oligosaccharides to understand the interactions between proteins and heparan sulfate. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 50, p. 155–161, 2018.

XU, K.; JIN, L. The role of heparin/heparan sulphate in the IFN- $\gamma$ -led Arena. **Biochimie**, v. 170, p. 1–9, 2020.

ROMAN, H. P. O.; BARDDAL, M. I.; ACOMINI, G. L.; SASSAKI; CIPRIANI, T. R.

Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pectin. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 731–739, 2017.

ZHANG, L. **Glycosaminoglycan (GAG) Biosynthesis and GAG-Binding Proteins**. p.1-7, 2010.

ZHOU, Z.; LI, Q.; HUANG, H.; WANG, H.; WANG, Y.; DU, G.; CHEN, J.; KANG, Z. A microbial–enzymatic strategy for producing chondroitin sulfate glycosaminoglycans. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 1561–1570, 2018.

ZOU, Z.; WEI, M.; FANG, J.; DAI, W.; SUN, T.; LIU, Q.; GONG, G.; LIU, Y.; WANG, Z. Preparation of chondroitin sulfates with different molecular weights from bovine nasal cartilage and their antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 1047–1055, 2020.

ZULUETA, M. M. L.; CHYAN, C. L.; HUNG, S. C. Structural analysis of synthetic heparan sulfate oligosaccharides with fibroblast growth factors and heparin-binding hemagglutinin. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 50, p. 126–133, 2018.



