



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA (PPGBQF-UFPE)**

**NOVO MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS, CÁLCIO,
QUITINA, CAROTENÓIDES E GLICOSAMINOGLICANOS DE
CABEÇAS DE CAMARÃO**

THIAGO BARBOSA CAHÚ

**ORIENTADOR: RANILSON DE SOUZA BEZERRA
CO-ORIENTADOR: LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR**

**RECIFE
2010**

THIAGO BARBOSA CAHÚ

**NOVO MÉTODO PARA OBTENÇÃO DE HIDROLISADO
PROTÉICO, CÁLCIO, QUITINA, CAROTENÓIDES E
GLICOSAMINOGLICANOS DE CABEÇAS DE CAMARÃO**

Dissertação apresentada ao
**Programa de Pós-graduação
em Bioquímica e Fisiologia** para
o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de **Mestre em Bioquímica
e Fisiologia** pela **Universidade
Federal de Pernambuco**.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.

Recife
2010

Cahú, Thiago Barbosa

Novo método para obtenção de hidrolisado protéico, cálcio, quitina, carotenóides e glicosaminoglicanos de cabeças de camarão / Thiago Barbosa Cahú. – Recife: O Autor, 2010.

84 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos

1. Bioquímica 2. Compostos orgânicos 3. Proteínas 4. Enzimas 5. Carboidratos 6. Camarão I. Título.

Thiago Barbosa Cahú

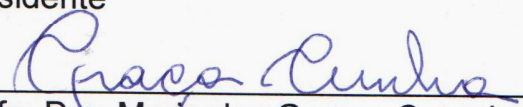
**“Novo Método para obtenção de proteínas, cálcio, quitina, carotenóides
e glicosaminoglicanos de cabeças de camarão”**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

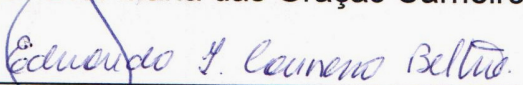
Aprovado por:



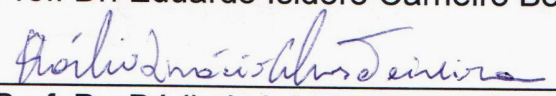
Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Presidente



Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha



Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão



Prof. Dr. Dálio Inácio Alves Teixeira

Data: 24 / 02 / 2010

ÍNDICE

Dedicatória	i
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
Introdução:	iv
Artigo Científico:	v
LISTA DE TABELAS	vi
Introdução:	vi
Artigo Científico:	vi
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produção	1
1.2. Utilização de subprodutos do processamento do camarão como fonte de biomoléculas	4
1.3 Carotenóides	7
1.4 Proteínas de camarão	10
1.5 Quitina e Quitosana	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
3. OBJETIVOS	35
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
4. ARTIGO CIENTÍFICO:	36
Abstract	38
1. Introduction	39
2. Materials and Methods	40
2.1 Shrimp head enzymatic autolysis	40
2.3 Carotenoids HPLC analysis	41
2.4 Preparation of chitin and chitosan	42
2.5 Extraction and partial purification of glycosaminoglycans	42
2.6 NMR and FT-IR spectroscopy Analysis of Chitosan	43
2.7 Potentiometric Titration of Chitosan Solution	43
2.8 Elemental Analysis	44
2.9 Electrophoresis of Glycosaminoglycans	44
2.10 Enzymatic Degradation with Glycosaminoglycans Lyases	45
3. Results and Discussion	45
4. Conclusions	54
Acknowledgments	55
References	55
Figure Captions	65
Tables	67
Figures	69
5. CONCLUSÕES	75
6. ANEXOS	76
Normas para redação de artigos científicos para a revista “Bioresource Technology”:	76
Subject Classification For Bioresource Technology	81
Ata da defesa	84

*Aos meus pais, Mauro e
Edilene, meus parâmetros
de caráter e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial aos meus pais, Mauro Roberto Mendes Cahú e Maria Edilene Barbosa Cahú, pois o amor e incentivo constantes dados foram imprescindíveis.

Ao professor Ranilson de Souza Bezerra por sua dedicação e ensinamentos passados.

Ao professor Luiz Bezerra de Carvalho Júnior também pelos sábios ensinamentos.

A professora Helena Bonciani Nader pela oportunidade de aprender tantas coisas novas e interessantes.

Aos membros da banca examinadora, Professores Maria das Graças, Helena Nader, Eduardo Beltrão, Márcia Vanusa, Dárlio Teixeira e Luiz Bezerra por disporem do seu tempo para me ajudar na conclusão deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, professores e funcionários.

Aos amigos do Laboratório de Enzimologia, Augusto Cezar, Caio Dias, Fábio Marcel, Gilmar Cezar, Helane Costa, Janilson Felix, Juliana Santos, Juliett Xavier, Karina Ribeiro, Karoll Lopes, Marina Marcuschi, Patrícia Castro, Renata França, Robson Coelho, Suzan Diniz, Werlayne Mendes. Um agradecimento especial a Marina Marcuschi pelos momentos de trabalho e descontração compartilhados. A Janilson Félix pela atenção e contribuições prestados. A Guto Freitas Júnior pela ajuda nos momentos complicados.

Aos amigos do LIKA, Fábio Fidélis, Luiza Rayana, Marina Cabrera, Ricardo Souza, Vanessa Brustein.

Aos meus novos e antigos amigos do INFAR, Aline Mendes, Carolina Córdula, Daniel Silvestre, Diego Buarque, Keila Vasselo, Mariana, Rafael de Lima. Um agradecimento

especial a Carol Córdula, Diego Buarque e Aline Mendes pela amizade e ajuda imprescindíveis.

Aos meus grandes amigos para todas as horas Anselmo Alves, Diana Maria, e Fernanda Tenório.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica Albérico, Neide, Miron, Ademar, Dona Helena, e Sr João

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pela concessão da bolsa de Mestrado.

A Netuno Ltda. pelo fornecimento das matérias primas.

LISTA DE FIGURAS

Introdução:

	Página
Figura 1. Espécies mais utilizadas na aquicultura continental brasileira.	1
Figura 2. Produção da aquicultura mundial por região em 2006 (FAO, 2009).	2
Figura 3. Produção global atualizada de aquicultura do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> (FAO, 2006).	4
Figura 4. Esquema da utilização de subprodutos de camarão (GILDBERG & STENBERG, 2001).	6
Figura 5. Via de bioconversão dos carotenóides no camarão <i>Penaeus</i> , e via de conversão de retinóis (NÈGRE-SADARGUES et al., 2000).	8
Figura 6. Estrutura da quitina, quitosana e celulose.	14
Figura 7. Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos sulfatados.	18
Figura 8. Ação das liases de heparina e heparam sulfato em um glicosaminoglicano hipotético (NADER et al., 1999a). A heparitinase I e heparinase apresentam uma especificidade de substrato seletiva, requerendo para a atividade β -D-glucuronil (1 $\rightarrow$ 4) glucosamina N-sulfato ou N-acetilglucosamina e α -L-iduronil- 2-O sulfato (1 $\rightarrow$ 4) glucosamina N-sulfato ou glucosamina N,6-dissulfato, respectivamente.	19
Figura 9. Mecanismo de ação das condroitinases de <i>Proteus vulgaris</i> .	20
Figura 10. Mecanismo de ação da heparitinase II sobre o tetrassacarídeo sulfatado produzido pela heparinase a partir de heparina.	21
Figura 11. Estruturas dos dissacarídeos insaturados produzidos pela ação das diferentes liases de glicosaminoglicanos.	22
Figura 12. Árvore filogenética de distribuição de glicosaminoglicanos sulfatados no reino animal (MEDEIROS et al., 2000).	23

Figure 1: Scheme for utilization of shrimp head waste for recovery of biomolecules. 69

Figure 2: ^{13}C NMR acquisitions of chitosan 1 fold and 2 fold deacetyled using 50% (w/v) NaOH at 65°C for 20 h. Carbons peaks are represented by the atoms present in the N-(acetyl)-glucisamine structure. Peak 178.8 disappears while 23.3 slightly decreases, representing C=O and CH₃ of the acetyl group respectively, indicating that deacetylation occurred. 70

Figure 3: FT-IR of chitin (1) and chitosan (2). 71

Figure 4: FT-IR of chitosan 1 fold deacetyled (1), 2 fold deacetyled (2) and purified chitosan (3). 72

Figure 5: Electrophoresis of glycosaminoglycans extracted from shrimp waste. A-Propylene diamine acetate (PDA) buffer 0.05 M pH 9.0; B-Tris acetate 0.05 M pH 8.0; C-Discontinuous barium acetate 0.04 M pH 4.0/PDA buffer. 73

Figure 6: Paper chromatography analysis of the products formed through the action of heparitinases I and II, heparinase, chondroitinases AC and ABC and a mixture of enzymes in 1,2-diaminoethane acetate pH 7.0 in a final volume of 30 uL for 18 h at 30°C. Aliquots (20 µl) of the incubation mixtures were applied to Whatman No. 1 paper and subjected to descending chromatography in isobutyric acid:1 M NH₃, 5:3, v/v for 36 h. The products were identified after silver nitrate staining. $\Delta\text{U}, 2\text{S-GlcNS}, 6\text{S}$, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid 2-sulfate)-(1→4)-2-sulfamino-D-glucose 6-sulfate; $\Delta\text{U-GlcNS}, 6\text{S}$, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid)-(1→4)-2-sulfamino-D-glucose 6-sulfate; $\Delta\text{U-GlcNS}$, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid)-(1→4)-2-sulfamino-D-glucose; $\Delta\text{U-GlcNAc}, 6\text{S}$, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid)-(1→4)-2-acetamido-D-glucose 6-sulfate; $\Delta\text{U-GlcNAc}$, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid)-(1→4)-2-acetamido-D-glucose. 74

LISTA DE TABELAS

Introdução:

	Página
Tabela 1: Produção de camarão no Brasil em toneladas por ano.	3
Tabela 2: Composição centesimal de hidrolisados de diferentes espécies (animal inteiro) (ARVANITOYANNIS & KASSAVETI, 2008; ZHANG et al., 2002; HOSSAIN et al., 2003; KHAN et al., 2003; RUTTANAPORNVAREESAKUL et al., 2005).	12
Tabela 3: Composição centesimal e valor calórico do hidrolisado protéico de camarão liofilizado produzido por autólise (SILVA, 2006).	13

Artigo Científico:

	Página
Table 1: Yield of all compounds isolated from 1.0 kg of shrimp head waste (205.5 g dwb)	67
Table 2: Comparson of calculated degree of deacetylation using diferent methods (%).	68

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

CETAVLON	N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide
CS	Condroitim Sulfato
DD(%)	Grau de desacetilação
DS	Dermatam sulfato
EDA	Etilenodiamina acetato
FAO	Organização da Nações Unidas para Agricultura e Alimentos
FT-IR	Espectroscopia de Infra Vermelho por Transformada de Fourier
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
HS	Heparam sulfato
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
PDA	1,3-diaminopropano acetato
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Valor da constante de dissociação ácida
PBS	Tampão Fosfato Salina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
U	Unidade de atividade enzimática
WHO	Organização Mundial da Saúde
WSSV	Vírus da mancha branca do camarão
Δ	Insaturação
ΔU	Ácido Urônico insaturado (C-4)
$\Delta U\text{-GlcNAc}$	O-(ácido 4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-D-glucose
$\Delta U\text{-GlcNS}$	O-(4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-sulfamino-D-glucose
$\Delta U\text{-GlcNAc,6S}$	O-(ácido 4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-D-glucose 6-sulfate
$\Delta U\text{-GlcNS,6S}$	O-(ácido 4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-sulfamino-D-glucose 6-sulfate
$\Delta U,2S\text{-GlcNS,6S}$	O-(ácido 4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico-2-sulfato)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-sulfamino-D-glucose 6-sulfato

Δ U-GalNAc,4S	O-(ácido 4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico)-(1→3)-2-acetamido-D-galactose-4-sulfate
Δ U-GalNAc, 6S	O-(ácido 4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico)-(1→3)-2-acetamido-D-galactose-6-sulfato
Δ U-GlcNAc/HA	O-(ácido 4-desoxi-hex-4-enopiranosilurônico)-(1→ 4)-2-acetamido-D-glucose (Ácido hialurônico).

RESUMO

Nos últimos anos, a indústria pesqueira brasileira tem vivenciado um período importante de desenvolvimento. Mas, juntamente com o crescimento na produção, tem-se o aumento da quantidade de resíduos gerados no processamento do pescado, que usualmente são descartados no ambiente, causando poluição. Os resíduos do processamento são constituídos por cabeças, carcaças e vísceras de peixes, cabeças e cascas de crustáceos e fauna acompanhante, e podem representar de 20 a 70% do pescado comercializado. O aproveitamento dos resíduos incrementa a economia do setor industrial pesqueiro e permite que essa atividade seja mais ecologicamente sustentável e economicamente viável. O mal uso de subprodutos do processamento de pescados é considerado por muitos um desperdício de moléculas biativas valiosas. As cabeças de camarão representam um dos principais resíduos do processamento de pescados e constituindo em até 50% do peso total do animal. Esse material é utilizado atualmente como fonte de proteína e na produção de quitina das cascas, matéria prima para produção comercial de quitosana. Diversos métodos são empregados para a recuperação de hidrolisados protéicos e quitina, dentre eles a hidrólise utilizando proteases exógenas. Entretanto, o emprego destas enzimas encarece o processo tornando-o pouco adequado para o uso industrial. Nas cabeças de camarões estão contidas as vísceras (parte do trato digestivo) que possuem enzimas hidrolíticas que podem ser aplicadas na solubilização dos tecidos e deproteinização das cascas, facilitando as etapas de extração e purificação dos produtos. No presente trabalho é descrito um novo método para obtenção de vários compostos a partir de cabeças de camarão (*Litopenaeus vannamei*) submetidas à autólise. No processo, foi obtido hidrolisado protéico, carotenóides, quitina e quitosana e glicosaminoglicanos sulfatados. A partir de 1kg de cabeças obteve-se 1,46L de hidrolisado protéico (solução a 9%) e 194mg de carotenóides totais, sendo 111,96mg de carotenóides não identificados e 82,56mg de astaxantina. A partir de 53g de carapaça foram obtidas cerca de 25g de quitina e 17g de quitosana. Quitina e quitosana foram analisadas por espectroscopia de ^{13}C -RMN e FT-IR para comprovar a efetiva desacetilação dos resíduos de N-acetilglucosamina. O grau de desacetilação foi calculado por titulação potenciométrica, análise elementar e FT-IR para quitosana produzidas a partir uma e duas desacetilações bem como a quitosana purificada. Os valores obtidos encontram-se ente 60-80%. O conteúdo de glicosaminoglicanos obtidos do sedimento após extração de carotenóides e

lipídios foi de 23,32 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de subproduto e mostraram migração eletroforética semelhante aos padrões de mamífero. As frações precipitadas foram suscetíveis à ação das heparitinases I e II, o que sugere a presença de um heparan sulfato. As biomoléculas recuperadas a partir de cabeças de camarão possibilitam um amplo espectro de aplicações como na suplementação e formulação de rações animais, em abordagens biomédicas e biotecnológicas.

Palavras chave: Autólise, Glicosaminoglicanos sulfatados, *Litopenaeus vannamei*, Quitina, Quitosana, Resíduo do processamento de camarão.

ABSTRACT

Recently, the Brazilian fishery processing industry has reached an important period of growth. However, with the larger productivity the amount of byproducts grew as well, being mostly discarded freely in the environment, causing pollution. These processing wastes are constituted of fish heads, carcass and viscera, crustacean heads and carapace and bycatch, which represent 20-70% of commercialized fishery. The use of waste promotes the economy of fishery processing industries rendering it a more ecologically friendly and economically viable activity. The discard of fishery processing byproducts is considered by many as a waste of bioactive molecules. Shrimp heads represent about 50% of the whole shrimp, and are usually used as a protein source in the production of chitin from carapace which is the raw material for chitosan production. Many methods are available for recovery of protein hydrolysates and chitin from shrimp heads, including hydrolysis using exogenous proteolytic enzymes. Yet, the utilization of enzymes greatly increases the producing cost making it less feasible. Shrimp heads, which bears part of the digestive tract, contains hydrolytic enzymes capable of solubilizing tissues and promoting the deproteinization of the carapace, making the steps of products extraction and purification easier. In this work we present a new method to obtain multiple compounds from shrimp heads (*Litopenaeus vannamei*) submitted to autolysis. Through this process, it was obtained protein hydrolysate, carotenoids, chitin, chitosan and sulfated glycosaminoglycans. One kilogram of heads yielded 1.46L (9% dry matter) of hydrolysate and 194.5mg of total carotenoids, from which 111.96 represented unidentified carotenoids and 82,56mg of astaxanthin. From 53g of carapace it was obtained 25g of chitin and 17g of chitosan. Chitin and Chitosan were analyzed by ^{13}C -NMR and FT-IR to verify the effectiveness of the deacetylation. The deacetylation degree was calculated by potentiometric titration, elemental analysis and FT-IR for chitosan produced by one and two cycles of deacetylation, as well as for purified chitosan and the calculated degrees were between 60-80% deacetylation. The content sulfated of glycosaminoglycan in the sediment after carotenoids extraction was 23.32 μg per kg of waste and showed electrophoretic migration similar to mammalian standards. The fractions showed susceptibility to heparitinase I and II action, which suggests the presence of an heparan sulfate in the mixture. The recovered biomolecules from shrimp heads have a broad spectrum of applications such as supplementation and

formulation of animal and aquaculture food, and in biomedical and biotechnological approaches.

Keywords: Autolysis, Chitin, Chitosan, *Litopenaeus vannamei*, Shrimp processing waste, Sulfated glycosaminoglycans.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção

A atividade pesqueira no Brasil, que envolve a pesca extrativa e aquicultura, marinha e continental, tem aumentado nas últimas décadas. No ano de 2007, a aquicultura continental teve como principais espécies cultivadas a carpa comum (*Cyprinus carpio*), curimatã (*Prochilodus cearensis*), camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*), tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1), tambaqui (*Colossoma macroporum*), e tilápia vermelha (*Oreochromis ssp.*) (IBAMA, 2007). O cultivo de camarão, juntamente com a tilapicultura, continua em expansão, principalmente na região Nordeste.

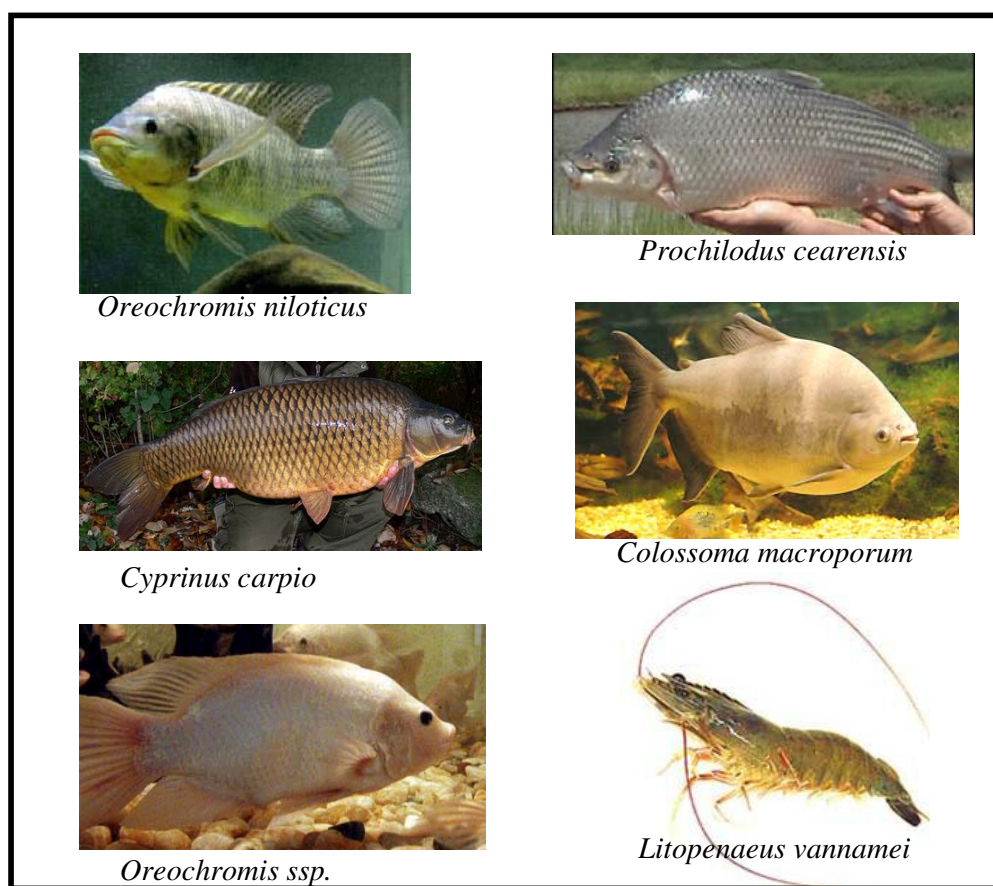


Figura 1: Espécies mais utilizadas na aquicultura continental brasileira.

A contribuição da aquicultura para o suprimento global de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos continua a crescer, tendo a produção total de

pescado aumentado de 3,9% 1970 para 27,1% em 2000 e 36% em 2006. A aquicultura continua a crescer mais do que qualquer outro setor de produção de alimento de origem animal. Mundialmente, este setor tem crescido com uma taxa média de 8,8% ao ano desde 1970, comparado com apenas 1,2% da pesca extrativa e 2,8% para os sistemas de produção terrestre de carne no mesmo período. A produção da aquicultura tem superado grandemente o crescimento da população mundial, com o suprimento per capita aumentando de 0,7 kg em 1970 para 7,8 kg em 2006, representando uma taxa de crescimento anual médio de 7% (FAO, 2009).

A aquicultura mundial tem crescido significativamente durante os últimos 50 anos. De uma produção abaixo de um milhão de toneladas no começo da década de 1950, a produção em 2006 foi de 51,7 milhões de toneladas, correspondendo a um valor de US\$78,8 bilhões. Isto significa um aumento médio anual de 6,9% em quantidade e 7,1% em valor em relação a 2002. Em 2006, as nações da Ásia e da região do Pacífico representaram 89% da produção em quantidade e 77% em valor. Do total mundial, a China representa 69,6% da produção em quantidade e 51,2% em valor da produção de aquicultura (Figura 2) (FAO, 2009).

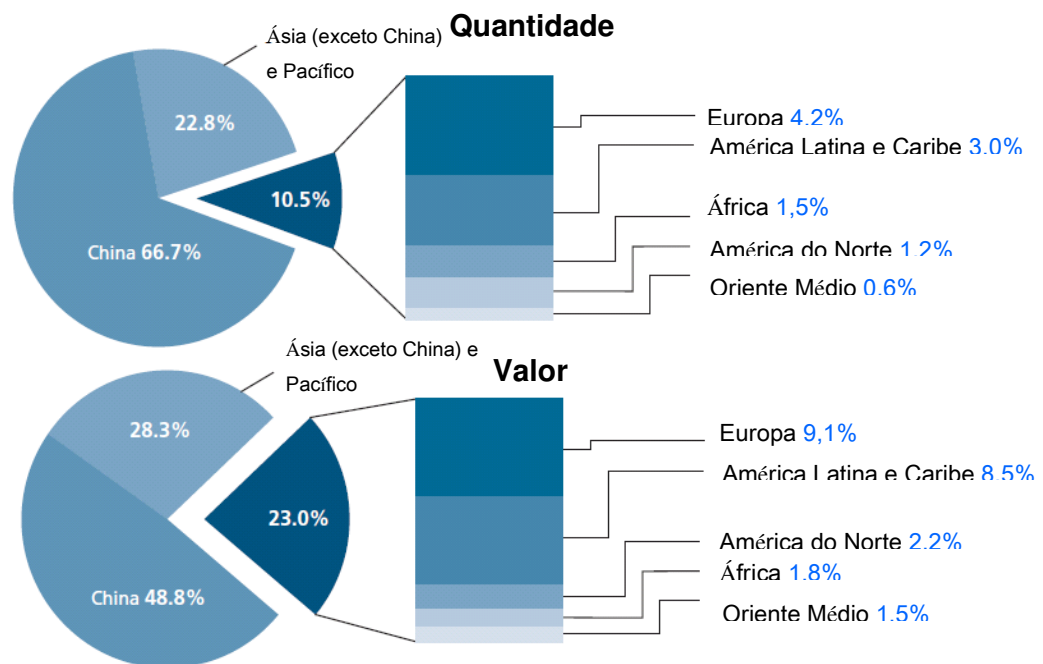


Figura 2: Produção da aquicultura mundial por região em 2006 (FAO, 2009).

A aquicultura mundial produziu em 2004 cerca de 2,5 milhões de toneladas de camarão, um crescimento de 28,7% em relação a 2002. (FAO, 2007). Dentre os vários ramos da aquicultura, a carcinicultura é um dos mais produtivos, tendo sido responsável por cerca de 20% da produção mundial de camarão em 2002 (PINHEIRO, 2007). No Brasil, as primeiras atividades de cultivo de camarão iniciaram-se na década de 70, na região Nordeste, com a introdução da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus* (Barbieri Júnior & Ostrensky Neto, 2002). Na década de 80, os produtores tentaram introduzir outras espécies exóticas bem sucedidas no mercado internacional, como *Penaeus monodon*, em 1981, *Litopenaeus vannamei* e *Litopenaeus stylirostris*, em 1983 (FAO 2006). Mas, foi apenas em meados da década de 90, que se conseguiu estabelecer o manejo da espécie exótica *L. vannamei*, tornando-se este o principal camarão cultivado do país (ROCHA, 2008).

Tabela 1: Produção de camarão no Brasil por ano, em toneladas.

Estado	2003	2004	2005
Pará	324,0	242,0	278,0
Maranhão	703,0	266,0	246,0
Piauí	3.309,0	2.541,0	2.239,0
Ceará	25.915,0	19.405,0	17.356,0
Rio Grande do Norte	37.473,0	30.807,0	25.063,0
Paraíba	3.323,0	2.963,0	1.672,0
Pernambuco	5.831,0	4.531,0	3.568,0
Alagoas	130,0	102,0	122,0
Sergipe	957,0	2.543,0	2.924,0
Bahia	8.211,0	7.577,0	5.844,0
Espírito Santo	370,0	370,0	435,0
Paraná	390,0	310,0	637,0
Santa Catarina	3.251,0	4.267,0	2.726,5
Rio Grande do Sul	3,0	20,0	23,0
Total	90.190,0	75.904,0	63.133,5

FONTE: IBAMA, Estatísticas da Pesca (2004, 2005, 2007).

Pertencente à família Penaeidae, o *L. vannamei* tornou-se a principal espécie de camarão cultivada no Brasil com uma produção que alcançou 90.190 t em 2003. O Nordeste contribui com 93% de todo o camarão produzido no Brasil e Pernambuco é responsável por 5,5% com uma produção de 63.133,5 t em 2005 (IBAMA, 2007).

O camarão *L. vannamei* é um dos mais bem estudados por ser umas das principais espécies de camarão cultivadas no mundo. Apenas em 2005, foram produzidas 1.599.423 toneladas de camarão desta espécie (TACON, 2007). Uma das

vantagens do *L. vannamei* é a sua adaptabilidade a águas turvas e com baixa concentração de oxigênio, característica que permitiu a disseminação do cultivo em várias partes do mundo. Na Figura 3 é mostrado o crescimento mundial da produção de *L. vannamei*.

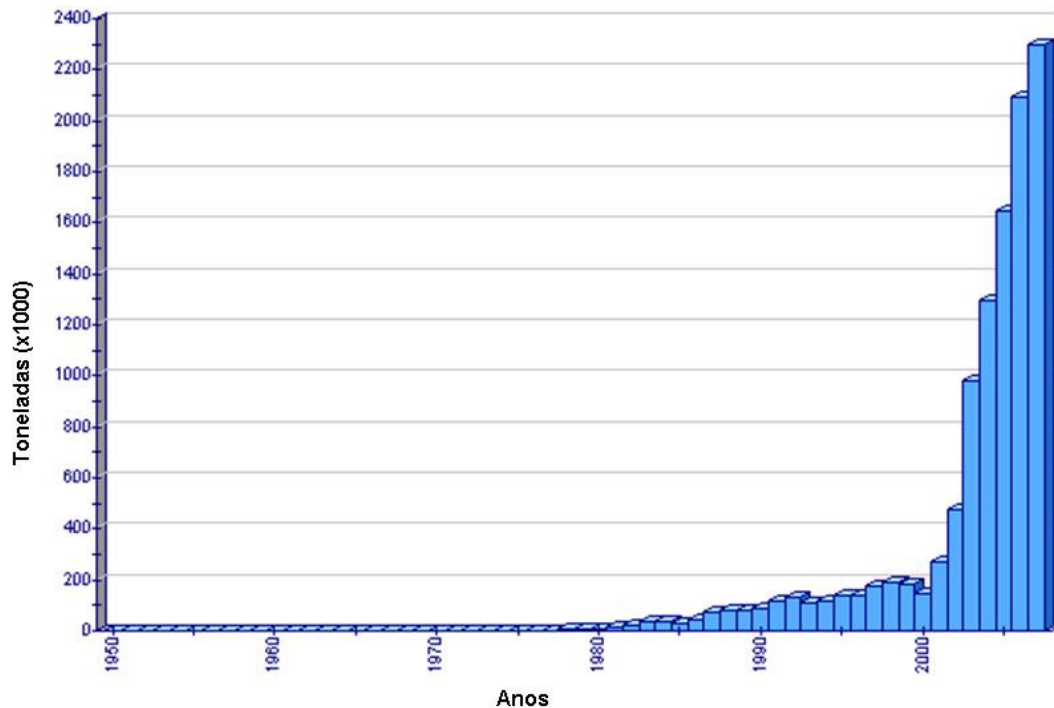


Figura 3: Produção global de aquicultura do camarão *Litopenaeus vannamei* (FAO, 2006).

Estatísticas da FAO mostram que a produção por aquicultura do *L. vannamei* aumentou de 8.000 t em 1980 para 194.000 t em 1998. Depois de um pequeno declínio em 1999 e outro mais significativo em 2000 devido à chegada do vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) na América Latina, houve um rápido aumento na produção para mais de 1.386.000 t em 2004, devido à rápida difusão dessa espécie pela Ásia. Alguns dos principais países produtores em 2004 foram China (700.000 t), Tailândia (400.000 t), Indonésia (300.000 t) e Vietnã (50.000 t) (FAO, 2006).

1.2. Utilização de subprodutos do processamento do camarão como fonte de biomoléculas

No processamento industrial do camarão aproximadamente 50% do peso do animal corresponde aos subprodutos (cabeças, caudas e carapaças) (ISLAM et al.,

2004). De acordo com esse percentual somente em 2003 cerca de 26.000 t de cabeças e cascas foram geradas no Brasil (SANTOS, 2006).

O desperdício de subprodutos de peixes, moluscos e crustáceos representa de 20% a 70% do pescado comercializado (MACKIE, 1982). Esta constatação tem despertado grande interesse da comunidade científica, quanto ao aproveitamento desses subprodutos, sobretudo as vísceras, dos quais são extraídas moléculas bioativas como enzimas, passíveis de diversas aplicações industriais (DE VECCHI & COPPES, 1996).

A utilização de subprodutos do processamento do pescado para a recuperação de biomoléculas como carotenóides (SANTOS, 2006), colágenos (HWANG et al., 2007) e enzimas (BEZERRA et al., 2005; ESPÓSITO, 2006; ASSIS et al., 2007) tem sido reportada, com várias aplicações, por exemplo, na indústria farmacêutica e para aplicações biomédicas (FAO, 2009). Diversos trabalhos reportam o uso de cabeças de camarão para a obtenção de hidrolisados protéicos (GILDBERG & STENBERG, 2001), carotenóides (BABU et al., 2008; SACHINDRA & MAHENDRAKAR, 2005; SACHINDRA et al., 2006), quitina e quitosana (GILDBERG & STENBERG, 2001) e glicosaminoglicanos heparina-símile (DIETRICH et al., 1999; BRITO et al., 2008).

Usualmente os subprodutos do processamento do camarão são submetidos à hidrólise enzimática com a aplicação de proteases como alcalase, papaína, pepsina, quimotripsina ou tripsina (SILVA, 2006). Essas enzimas promovem a solubilização das proteínas, permitindo também a recuperação de complexos de carotenoproteína e deproteinização da carapaça de quitina. A utilização de enzimas proteolíticas, entretanto, limita a produção destes bioprodutos de cabeça de camarão, pois encarecem o processo. Uma forma de contornar esta dificuldade está no uso das enzimas endógenas presentes na cabeça do camarão (fosforilases e lipases) e no hepatopâncreas (enzimas digestivas) (CAO et al., 2009).

Aoki et al. (2004) purificaram parcialmente proteases do camarão *Pandalus borealis*, para amaciamento de carne. As enzimas da cabeça de camarão foram extraídas, purificadas parcialmente, dissolvidas em PBS (pH 7,4) e diluídas para uma concentração final de 10 ug/L e então adicionada à carne. A mistura foi incubada por 1 h a 10°C e então cozida a 70°C e armazenada a 4°C por 24 h. Estas proteases de camarão podem ser usadas em escala industrial no setor de alimentos por terem se

mostrado eficiente no amaciamento de carne agindo em temperaturas baixas, o que resulta em economia de energia.

Bezerra (2000) descreveu para tambaqui, *Colossoma macropomum*, um processo de produção de hidrolisado protéico por autólise enzimática, com a vantagem de diminuir custos, já que utiliza enzimas do próprio animal. Normalmente usam-se enzimas comerciais (alcalase) para este procedimento, porém seu uso pode inviabilizar economicamente o processo.

Gildberg & Stenberg em 2001 demonstraram um método para utilização avançada de subprodutos de camarão submetidos à hidrólise proteolítica com Alcalase e obtiveram um hidrolisado protéico com alto valor nutritivo. No trabalho, os autores mostram como astaxantina pode ser recuperada a partir do sedimento centrifugado do hidrolisado bruto e o tratamento com Alcalase não influencia negativamente a recuperação ou a qualidade da quitosana produzida das carapaças. Este processo está representado na figura 4.

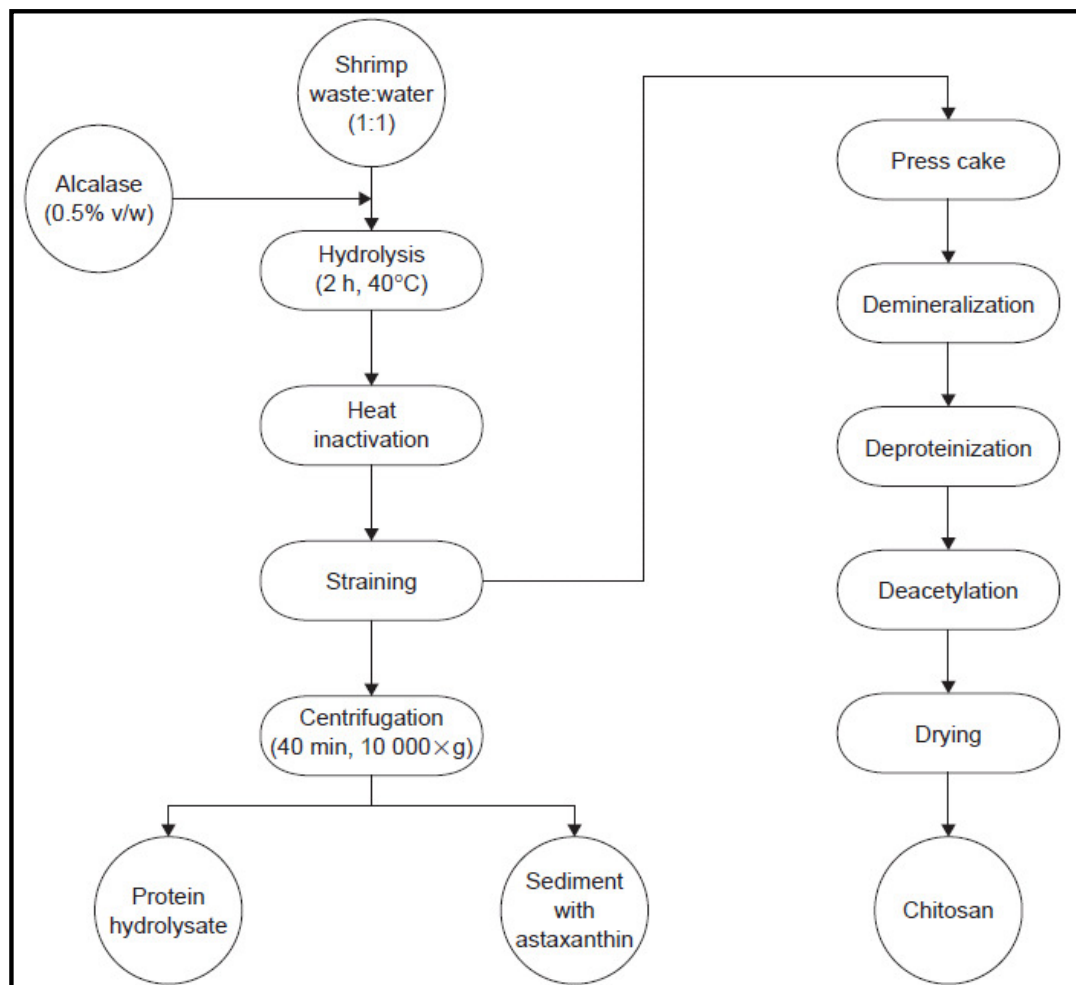


Figura 4: Esquema para utilização de subprodutos de camarão (GILDBERG & STENBERG, 2001).

Recentemente, diversas proteases foram extraídas de vísceras de peixes mostrando características interessantes para aplicações na biotecnologia e indústria, como na degradação de tecidos, extração de pigmentos, coagulação de proteínas, manejo de resíduos, amaciamento de carnes, formulação de detergentes e produção de hidrolisados protéicos (BEZERRA et al., 2001; ALENCAR et al., 2003; BEZERRA et al., 2005; ESPÓSITO, 2006; AMARAL et al., 2006; SOUZA et al., 2007; AMARAL, 2007).

1.3 Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis naturais também conhecidos como “lipocromos”. Na natureza, são produzidos por uma via metabólica de isoprenóides, também compartilhada por diversos compostos químicos como ácidos graxos essenciais, esteróides e as vitaminas A, D, E e K. Dentre as várias classes de pigmentos naturais, os carotenóides representam o grupo mais amplamente difundido e diversificado estruturalmente. São quase universalmente distribuídos, ocorrendo desde em bactérias e algas até em plantas angiospermas e mamíferos. Pelo menos 600 diferentes carotenóides já foram identificados. Eles são responsáveis por muitas das cores amarelo a vermelho em plantas e animais, assim como pela variedade de colorações marrom, azul, lilás, verde e negro vistas em muitos peixes e crustáceos (LATSCHA, 1990).

O metabolismo do β -caroteno é a principal fonte de vitamina A para animais. Tanto na natureza quanto por síntese química, o β -caroteno pode ser considerado como um composto básico para muitas reações químicas. A molécula consiste em 40 átomos de carbono arranjados em dois anéis β -ionona (Figura 5) conectados por uma cadeia de duplas ligações conjugadas que representa o cromóforo, responsável pela cor típica dos carotenóides (MEYERS & LATSCHA, 1997).

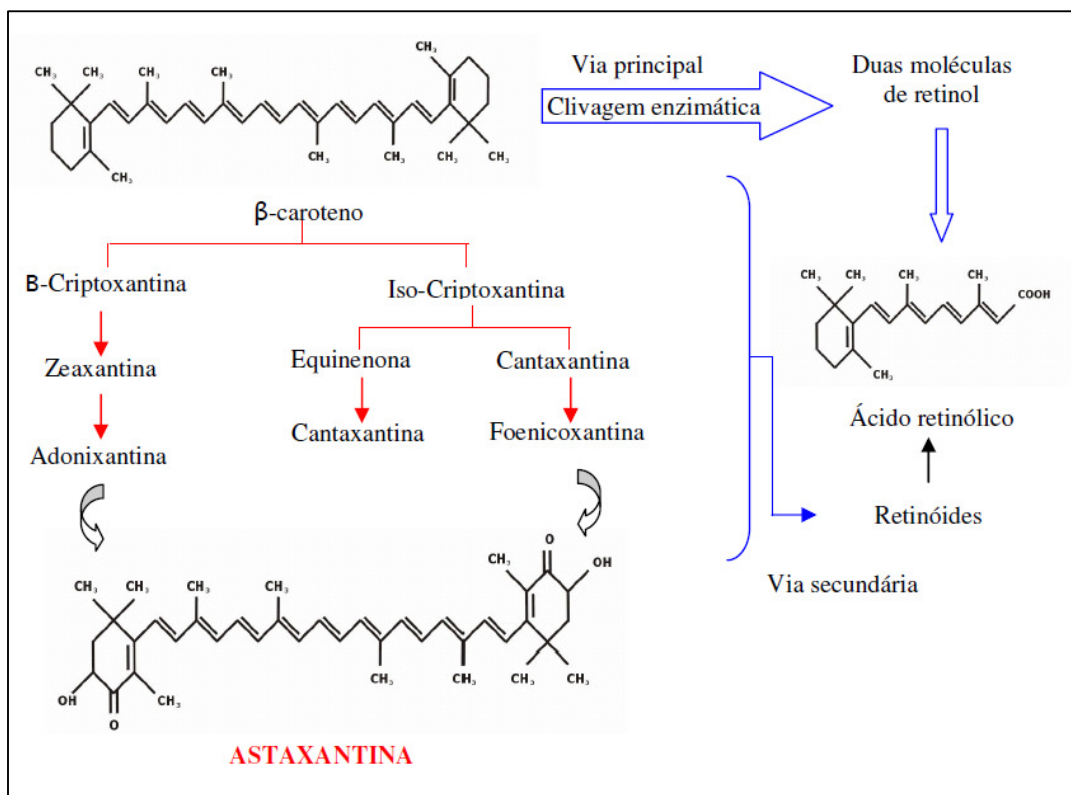


Figura 5: Via de bioconversão dos carotenóides no camarão *Penaeus*, e via de conversão de retinóis (NÈGRE-SADARGUES et al., 2000).

O β -caroteno pode ser convertido em vitamina A ou oxicarotenóides, denominados xantofilas. Desta forma, os carotenóides podem ser considerados tanto como produtos de degradação catabólica quanto de produtos da oxidação anabólica de carotenos. As xantofilas são os carotenóides mais importantes para peixes e camarões. As formas bicíclicas dos hidroxicarotenóides ou cetocarotenóides são as mais relevantes para a nutrição de animais aquáticos (MEYERS & LATSCHA, 1997).

Carotenóides, que podem ser encontrados livres e complexados a proteínas (carotenoproteínas) são responsáveis pelas diversas cores observadas em crustáceos. Estão presentes principalmente na carapaça, apêndices torácicos, sangue, olhos, ovos, hepatopâncreas e ovários (KUO et al., 1976; SANTOS, 2006). Uma vez que animais são incapazes de sintetizar carotenóides *de novo*, esses pigmentos são adquiridos da dieta a partir de organismos fotossintetizantes como microalgas, nas quais participam do processo de fotossíntese e na fotoproteção (BOHNE et al., 2002; JENSEN et al., 2007). Além de prover coloração, em animais os carotenóides atuam como antioxidantes e

precursores de vitamina A (VELU et al., 2003). As crustacianinas são proteínas presentes na carapaça de crustáceos que geralmente possuem como grupo prostético o carotenóide astaxantina.

O método de extração de carotenóides utilizando hidrólise enzimática dos tecidos do camarão é um procedimento bastante sutil que preserva a integridade dos carotenóides e ainda facilita o acesso de solventes ao pigmento, uma vez que as carotenoproteínas são também liberadas. Tem sido demonstrado que proteínas do resíduo de crustáceos podem ser hidrolisadas através de proteases comerciais e recuperadas como hidrolisado protéico. Durante este processo, a ligação do complexo carotenoproteína é quebrada antes da extração (CHEN & MEYERS, 1982) e os carotenóides são agregados a outros lipídeos. A tripsina e quimotripsina são as enzimas proteolíticas mais abundantes no hepatopâncreas de camarões, localizado na cabeça (MUHLIA-ALMAZÁN et al., 2002) e são responsáveis cerca de 60% da digestão proteolítica total em peneídeos.

Os subprodutos do processamento do camarão são uma importante fonte de carotenóides naturais, uma vez que a matéria prima é de baixo custo, podendo ser uma melhor alternativa para carotenóides sintéticos na formulação de rações para aquicultura, em alimentos (SACHINDRA & MAHENDRAKAR, 2005; SACHINDRA et al., 2006) e aplicação na indústria farmacêutica.

Carotenóides são responsáveis pela coloração de muitos produtos oriundos de peixes e crustáceos. Os frutos do mar mais caros, como camarão, lagosta, caranguejo, salmão, truta e atum possuem o intertegumento vermelho-alaranjado, e/ou carne contendo pigmentos carotenóides (ARVANITOYANNIS & KASSAVETI, 2008). Já foi observado que peixes com nível elevado de carotenóides são mais resistentes a doenças fúngicas e bacterianas (SHAHIDI et al., 1998). A astaxantina tem sido citada como principal carotenóide presente em alguns peixes como salmão e truta, bem como na maioria dos crustáceos como camarões, lagostas e caranguejos sendo um pigmento importante em organismos marinhos (DOMINGUEZ et al., 2005).

Subprodutos do camarão *Penaeus indicus*, como cabeças e carapaças foram usados para extração de carotenóides com óleos (SACHINDRA & MAHENDRAKAR, 2005), solventes orgânicos e mistura destes solventes (SACHINDRA et al., 2006), para

a otimização do processo de recuperação destes pigmentos. O rendimento ótimo foi obtido utilizando óleo de girassol (SACHINDRA & MAHENDRAKAR, 2005) e uma mistura de álcool isopropílico e hexano. Segundo os autores, embora os resultados obtidos sejam para o camarão *P. indicus*, também poderiam ser aplicados para subprodutos de outras espécies. O resíduo disponível após a extração de carotenóides também pode ser utilizado na produção de quitina e quitosana, numa abordagem integrada para utilização de subprodutos.

Uma dieta rica em carotenóides tem sido epidemiologicamente correlacionada com um risco reduzido de desenvolver diversas doenças (TAPIERO et al., 2004). As vias de sinalização influenciadas pela atividade antioxidante e propriedades bioquímicas dos carotenóides têm sido relatadas como um mecanismo básico de prevenção (STAHL & SIES, 2005). Os carotenóides realizam uma variedade de funções especialmente em relação à saúde humana e sua ação como antioxidantes biológicos. Atualmente, há um acentuado interesse em relação aos carotenóides dietários a respeito de suas ações contra doenças relacionadas à idade em seres humanos (FRASER e BRAMLEY, 2004).

A atividade de pro-vitamina A é a função mais bem conhecida dos carotenóides e está relacionada à clivagem da molécula do carotenóide para formar retinol. Em torno de 50 tipos estruturais têm a capacidade de agir como pró-vitamina A, uma vez que é necessário um anel β não substituído para a formação de retinóides. Os carotenóides β -caroteno, β -criptoxantina e α -caroteno são conhecidos como pró-vitamínicos. (FRASER & BRAMLEY, 2004). Embora outros carotenóides não tenham essa atividade, são importantes como antioxidantes plasmáticos (BERTRAM & VINE, 2005).

1.4 Proteínas de camarão

O camarão é um alimento rico em proteínas, cálcio, vitaminas e vários componentes extratíveis e tem sido usado como um dos mais populares e importantes ingredientes para preparações alimentares, em vários países, principalmente na Coreia. Durante o processamento, geralmente são removidas a cabeça, as cascas e a porção posterior do camarão. Recentemente, o consumo de camarão tem aumentado de forma considerável, face ao rápido crescimento da indústria de “fast-food”, acarretando, conseqüentemente, um volume bem maior das partes não comestíveis (cabeça, cascas e cauda), ocasionando problemas ambientais (HEU et al., 2003). A poluição gerada pelo

alto volume decorrente da produção de camarão requer a aplicação de métodos tradicionais de preservação bem como a viabilização da recuperação dos subprodutos (CIRA et al., 2002).

Vários estudos foram desenvolvidos utilizando camarões e seus subprodutos. Kim et al. (2003) estudaram as propriedades físico-químicas, as combinações ativas de sabores e componentes nutricionais do molho sal-fermentado, utilizando subprodutos de camarão e evidenciaram a sua alta qualidade. Estudos também foram desenvolvidos sobre a aplicação de subprodutos de camarão para a extração de caroteno-proteínas (CANO-LOPEZ et al., 1987), proteinases e exopeptidases em músculos de camarão (DOKE & NINJOOR, 1987), bem como seu uso como flavorizantes, em dietas humanas, e como fonte protéica em rações para a aquicultura (FAGBENRO, 1996).

Toma & James (1975) demonstraram que a proteína desperdiçada do camarão tem um valor nutritivo comparável ao da caseína e quando adicionada a dietas a base de soja, na proporção de 50%, melhora em 74% a qualidade protéica desta dieta. Os autores ainda enfatizam a potencial aplicação prática deste hidrolisado em ração ou como suplemento alimentar para animais, além da importância de sua utilização no controle da poluição aquática.

Pesquisas sobre a digestibilidade aparente e protéica de dietas formuladas a partir de subprodutos de peixes e crustáceos, dentre eles a cabeça de camarão constataram que estes subprodutos podem ser utilizados como fonte protéica alternativa, devido à sua alta digestibilidade (SUDARYONO et al., 1996; FAGBENRO & BELLO OLUSOJI, 1997).

Durante o processamento de camarão para obtenção da quitosana, os minerais e tecidos protéicos são quimicamente extraídos e descartados, e apenas 10% da matéria-prima seca é recuperada como quitosana, ou seja, para cada quilo de quitosana produzida, cerca de 3 Kg de proteína são desperdiçados (Gildberg & Stenberg, 2001). A proteína dos subprodutos do camarão pode ser hidrolisada por proteases disponíveis comercialmente e recuperada como hidrolisado protéico com alto conteúdo de aminoácidos essenciais (GILDBERG & STENBERG, 2001).

Bezerra (2000) e Bezerra et al. (2000, 2001), detectaram a presença de enzimas digestivas termorresistentes nas vísceras de peixes tropicais, o que lhes confere

potencial aplicação biotecnológica. A presença de enzimas proteolíticas nas vísceras de pescados também tem uma influência significativa na produção de hidrolisados.

O “Spray-Dryer” é um dos métodos mais empregados na conversão desde produto líquido para a forma de pó, com a vantagem adicional de ser de fácil manipulação e maior estabilidade, porém a temperatura empregada pode causar alguns efeitos na qualidade do produto final (ABDUL-HAMID et al., 2002). Estes autores demonstraram que a utilização do Spray-Dryer em temperaturas elevadas afeta, sobretudo, o conteúdo protéico, a umidade e o teor de todos os aminoácidos essenciais, exceto a metionina, do hidrolisado protéico da *Oreochromis mossambicus*.

A composição centesimal de hidrolisados enzimáticos de diversos animais aquáticos está representada na Tabela 2. A utilização desses animais para produção de alimentos funcionais para humanos é uma nova perspectiva para uso potencial do processamento e preservação de carnes de baixo valor comercial (ARVANITOYANNIS & KASSAVETI, 2008).

Tabela 2: Composição centesimal de hidrolisados de diferentes espécies (animal inteiro) (ARVANITOYANNIS & KASSAVETI, 2008; ZHANG et al., 2002; HOSSAIN et al., 2003; KHAN et al., 2003; RUTTANAPORNVAREESAKUL et al., 2005).

Espécie	Proteína (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
Krill Antártico (<i>Euphausia superba</i>)	86,2	5,8	8,2	0,03
Camarão Kuruma (<i>Penaeus japonicus</i>)	93,7	2,3	4,7	0,06
Camarão Veludo (<i>Metapenaeopsis acclivis</i>)	85,9	5,8	9,3	0,05
Lula (<i>Loligo edulis</i>)	87,7	7,0	3,3	0,07
Lula Japonesa (<i>Todarodes pacificus</i>)	87,7	6,1	3,4	0,26
Lula de Recife (<i>Sepioteuthis lessonania</i>)	87,9	6,1	3,4	0,21
Camarão Rosa do Norte (<i>Pandalus eous</i>)	89,8	4,7	4,6	0,02
Camarão-da-pedra (<i>Metapenaeus endeavouri</i>)	91,5	5,2	3,0	0,01
Camarão-tigre-gigante (<i>Penaeus monodon</i>)	91,0	5,1	3,6	0,01

Silva (2006) relatou que o hidrolisado protéico de cabeças do camarão *Litopenaeus vannamei* liofilizado é uma relevante fonte de aminoácidos essenciais e não essenciais com conteúdo superior ao recomendado pela FAO/WHO (1989) e ainda sem contaminantes, metais pesados ou coliformes fecais e totais. Estes resultados demonstraram que o hidrolisado de cabeças de camarão constitui uma excelente fonte alimentar. A composição centesimal desde hidrolisado é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Composição centesimal e valor calórico do hidrolisado protéico de camarão produzido por autólise e liofilizado (SILVA, 2006).

Componentes	Valores
Umidade (%)	9,68
Proteína (%)	43,63
Lipídios totais (%)	6,25
Cinzas (%)	7,32
Carboidratos (%)	33,12
Valor calórico (Kcal/100g)	363,27

A atividade da aquicultura requer rações de boa qualidade com um alto conteúdo de proteínas. Leal et al. (2009) testaram hidrolisado protéico de cabeças de camarão, substituindo a ração comercial para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com dietas formuladas com diferentes concentrações de hidrolisado. A composição de aminoácidos e dados de crescimento dos animais sugere que este hidrolisado pode ser utilizado como componente de ração para tilápia sem efeitos adversos no crescimento e na nutrição dos animais.

1.5 Quitina e Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da hidrólise alcalina do grupamento *N*-acetil da quitina, principal componente do exoesqueleto de artrópodes e da parede celular de alguns fungos, e ainda o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose. Atualmente a produção de quitina e quitosana é realizada através do tratamento de resíduos do processamento de crustáceos, matéria prima abundante em países como China, Japão, Índia e Brasil. São utilizadas carapaças de caranguejo, camarão, penas de lula e cabeças de camarão, nas quais o conteúdo de quitina chega a 11% (SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2000). A produção de quitosana de cascas de crustáceos é viável economicamente, principalmente quando associada à recuperação de carotenóides, uma vez que elas contêm uma considerável quantidade de astaxantina (KUMAR, 2000).

A quitosana é um heteropolímero composto por ligação $\beta(1\rightarrow4)$ de *N*-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina e formado através da desacetilação parcial da quitina, numa faixa de 80 a 85%, ou superior

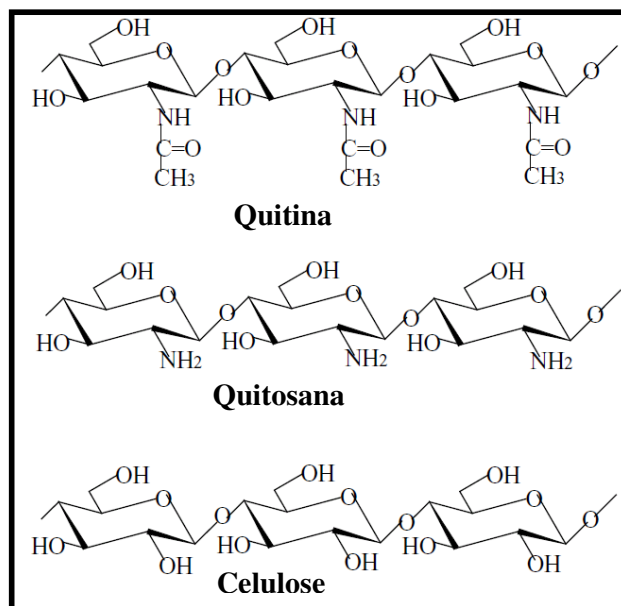


Figura 6: Estrutura da quitina, quitosana e celulose (Fonte: KRAJEWSKA, 2004);

Dependendo da fonte, a quitina pode ocorrer em duas formas, α e β . A forma α é a mais abundante, estando presente na parede celular de fungos, krill, lagostas, tendões e carapaça de caranguejos, cascas de camarão e cutículas de insetos. Por sua vez, a forma β -quitina é mais rara, encontrada, por exemplo, em penas de lula. A forma β mais reativa que a α , sendo esta uma importante propriedade relacionada às transformações enzimáticas e químicas da quitina (RINAUDO, 2006). A quitina pode ser encontrada parcialmente desacetilada em vários níveis de forma natural. As formas α e β da quitina têm microestrutura predominantemente cristalina, o que inviabiliza sua dissolução, na maioria dos solventes, sendo este um dos maiores problemas relacionado ao seu uso. Já a quitosana possui estrutura menos cristalina que a quitina, pela perda do grupo acetil, apresentando assim maior solubilidade em meio aquoso, embora seja virtualmente insolúvel em valores de pH neutros e alcalinos.

O grau de desacetilação determina características como, as propriedades ácido-básicas e solubilidade. A protonação do grupamento amina influencia o pK_a que adquire valores entre 6,3 e 6,7, o que também permite a dissolução em soluções ácidas diluídas. O peso molecular do polímero também influencia a viscosidade e solubilidade, afetando a acessibilidade e disponibilidade de sítios ativos. Uma característica peculiar adicional é a sua alta hidrofiliçidade, devido a um grande número de grupos hidroxila no polímero.

A quitosana é largamente utilizada para tratamento de efluentes, pois tem a capacidade de absorver íons metálicos e espécies orgânicas por causa dos grupamentos

amina e hidroxila na cadeia que formas ligações de coordenação e sítios reativos (JUANG et al., 2001).

Quitina e quitosana são polímeros com características interessantes para aplicações biotecnológicas e biomédicas. A natureza catiônica, rara entre polissacarídeos (geralmente ácidos ou neutros), permite a interação eletrostática com moléculas carregadas negativamente, principalmente a quitosana que assume a carga positiva em valores de pH menores que 6,7. Dentre as possíveis aplicações estão: cultura de células, carregamento de fármacos, cobertura anti-corrosão, filmes comestíveis antimicrobianos, engenharia de tecidos, imobilização de proteínas, adsorção de íons metálicos e corantes. A reconhecida biocompatibilidade e não-toxicidade da quitosana tornam possível seu uso em diversas aplicações biomédicas como preparação de filmes e membranas para pele artificial (SAHOO, 2009).

As propriedades da quitosana relacionadas à medicina regenerativa incluem a atração química e ativação de macrófagos e neutrófilos para iniciar o processo de cura de um ferimento, promoção de granulação do tecido, re-epitelização e enclausuramento de fatores de crescimento que aceleram a regeneração, limitação da formação de cicatriz, estimulação da mobilidade celular modulada por integrina e aumento da angiogênese *in vitro*. Ocorre concomitantemente também a liberação de monossacarídeos de glucosamina e *N*-acetilglucosamina e oligômeros, atividade antimicrobiana intrínseca e liberação controlada de agentes antimicrobianos exógenos para prevenir infecções. Ademais, a quitosana é não-tóxica, biodegradável, fácil de construir diversas estruturas, pode ser modificada quimicamente e enzimaticamente, é mucoadesiva, adequada para liberação controlada de citocinas, componentes da matriz extracelular e antibióticos, retenção da morfologia celular normal, promoção da adesão, proliferação e viabilidade de tecidos incluindo células tronco (MUZZARELLI, 2009).

A habilidade da quitosana de promover a cura de um ferimento pode ser atribuída a sua capacidade de formar complexos polieletrólíticos com glicosaminoglicanos (GAGs), especialmente com a heparina, que possui tanto propriedades anticoagulantes como angiogênicas (promove a vascularização do tecido). Os GAGs estão entre os blocos de construção essenciais da rede macromolecular de

conexão dos tecidos. A similaridade da estrutura química da quitosana com os GAGs evidencia sua possível utilização biomédica (KATALINICH, 1997).

1.6 Glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos, anteriormente denominados mucopolissacarídeos, são carboidratos poliméricos, na maioria sulfatados, compostos por unidades de dissacarídeos repetitivas, geralmente uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um ácido urônico (D-glucurônico ou L-idurônico), ou um açúcar neutro (galactose). A presença de grupamentos sulfato e carboxilas dos ácidos urônicos conferem elevada carga aniônica. Os glicosaminoglicanos ocorrem em todos os filos animais que apresentam organização tissular, desde poríferos até os cordados. Os principais glicosaminoglicanos encontrados em animais, de acordo com a nomenclatura de Jeanloz (1960) são: condroitim 4-sulfato, dermatam sulfato, condroitim 6-sulfato, ácido hialurônico, queratam sulfato, heparam sulfato e heparina (Figura 7). A variabilidade dos diferentes glicosaminoglicanos é devido aos diferentes pesos moleculares, unidades monossacarídicas, posição do grupamento sulfato e tipo de ligação glicosídicas inter- e intradissacarídica (Tabela 4).

Tabela 4: Características estruturais dos glicosaminoglicanos

Glicosaminoglicanos (Nomenclatura)		P. M. (Da)*	Monossacarídeos**	Posição do Sulfato	Ligação Glicosídica
Meyer (1938)	Jeanloz (1960)				
Condroitim sulfato A	Condroitim 4-sulfato	2-5 x10 ⁴	N-acetilgalactosamina Ácido glucurônico	4	β (1→4) β (1→3)
Condroitim sulfato B	Dermatam sulfato	2-5 x10 ⁴	N-acetilgalactosamina Ácido glucurônico Ácido idurônico	4 - -	β (1→4) β (1→3) α (1→3)
Condroitim sulfato C	Condroitim 6-sulfato	2-7 x10 ⁴	N-acetilgalactosamina Ácido glucurônico	6 -	β (1→4) β (1→3)
Ácido hialurônico	Ácido hialurônico	5-50 x10 ⁵	N-acetilglucosamina Ácido glucurônico	- -	β (1→3) β (1→4)
Querato sulfato	Queratam sulfato	1-3 x10 ⁴	N-acetilglucosamina Galactose	6 -6	α (1→4) α (1→4)
Heparitim sulfato	Heparam sulfato	1-6 x10 ⁴	Glucosamina N-acetilglucosamina Ácido glucurônico Ácido idurônico	2/6 -6 - -2	α (1→4) α (1→4) β (1→4) α (1→4)
Heparina	Heparina	0,5-5 x10 ⁴	Glucosamina Ácido glucurônico Ácido idurônico	2/6 - -2	α (1→4) β (1→4) α (1→4)

(Fonte: ANDRADE, 2006)

*A massa molecular média varia neste intervalo de acordo com a origem do glicosaminoglicano

**Todos os açúcares estão na configuração D, exceto o ácido hialurônico que apresenta configuração L.

Com exceção do ácido hialurônico, todos os glicosaminoglicanos são encontrados na forma de proteoglicanos. A estrutura do proteoglicano é caracterizada por um esqueleto protéico com glicosaminoglicanos ligados covalentemente através do trissacarídeo galactosil-glactosil-xilose por uma ligação O-glicosídica ao grupamento hidroxila de um resíduo de serina (TERSARIOL, 1995).

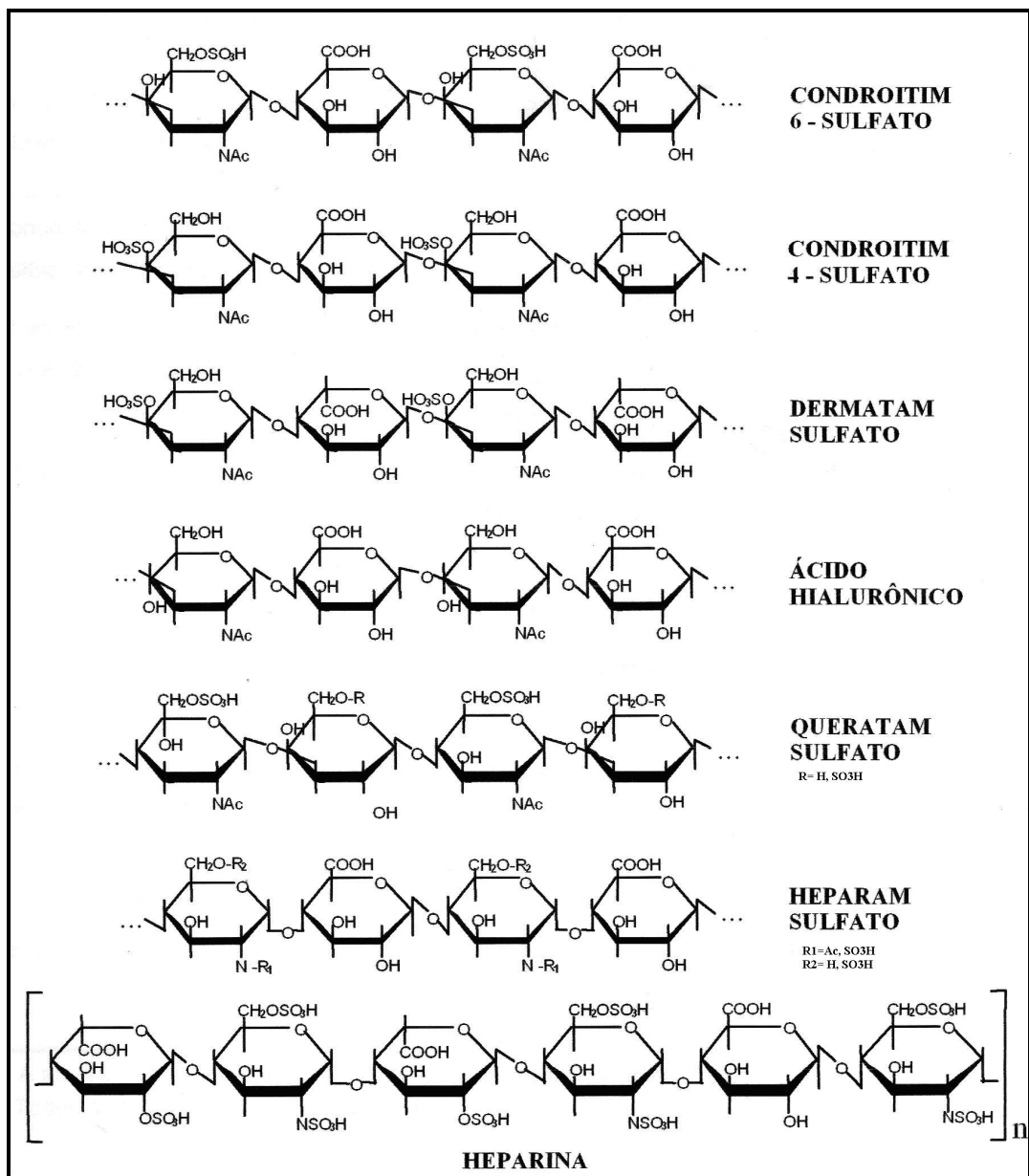


Figura 7: Unidades dissacarídicas constituintes dos glicosaminoglicanos sulfatados.

Uma das estratégias para determinação da estrutura dos diversos GAGs é a utilização de enzimas que degradam glicosaminoglicanos (NADER et al., 1999a). A *Flavobacterium heparinum* é uma bactéria que contém um sistema enzimático com atividade de liase capaz de degradar condroitim 4- e 6-sulfato e ácido hialurônico. Quando esta bactéria é cultivada em meios contendo heparina ou heparam sulfato é induzida a expressão de enzimas que degradam estes compostos (heparinase e

heparitinases I e II). Estas liases de *F. heparinum* despolimerizam diversos glicosaminoglicanos através de um mecanismo β -eliminativo (TERSARIOL, 1995).

As heparitinases I e II degradam o heparam sulfato produzindo quatro tipos distintos de dissacarídeos, que diferem entre si quanto ao grau de sulfatação e acetilação, bem como a posição em que são sulfatados. Em relação à especificidade, a heparitinase I quebra ligações glicosídicas do tipo α (1 $\rightarrow$ 4) entre D-glucosamina e ácido D-glucurônico, enquanto a heparitinase II pode quebrar tanto ligações glicosídicas entre D-glucosamina e ácido D-glucurônico quanto entre D-glucosamina e ácido L-idurônico, ambas do tipo α (1 $\rightarrow$ 4). Estas enzimas são eliminases e, portanto, introduzem uma insaturação entre C4 e C5 do resíduo de ácido urônico.

A heparinase é outra enzima extraída de *F. heparinum* que degrada a heparina quebrando ligações glicosídicas do tipo α (1 $\rightarrow$ 4) entre glucosamina N-sulfatada (que pode estar ou não sulfatada em C6) e ácido L-idurônico (obrigatoriamente sulfatado na posição C2). Esta enzima é uma liase promovendo também insaturação entre C4 e C5 do resíduo de ácido idurônico (Figura 8).

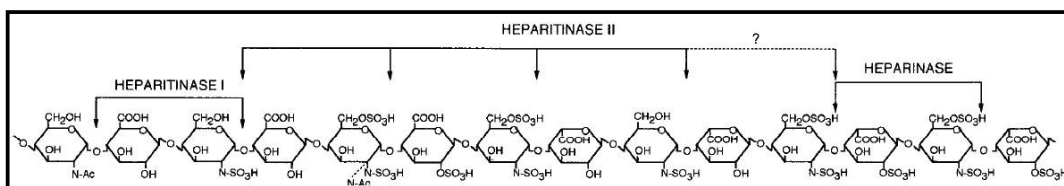


Figura 8: Ação das liases de heparina e heparam sulfato em um glicosaminoglicano hipotético (NADER et al., 1999a). A heparitinase I e heparinase têm uma especificidade de substrato seletiva, requerendo para atividade β -D-glucuronil (1 $\rightarrow$ 4) glucosamina N-sulfato ou N-acetilglucosamina e α -L-iduronil- 2-O sulfato (1 $\rightarrow$ 4) glucosamina N-sulfato ou glucosamina N,6-dissulfato, respectivamente.

A condroitinase AC também é purificada de *F. heparinum* e degrada condroitim 4- e 6-sulfato e ácido hialurônico, quebrando especificamente ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) entre N-acetilhexosamina e ácido glucurônico, que pode ou não apresentar sulfatação em C4 ou C6 (Figura 9).

A condroitinase ABC é uma enzima extraída de *Proteus vulgaris*, que degrada os condroitins 4- e 6-sulfato, dermatam sulfato e ácido hialurônico em seus dissacarídeos insaturados. É uma enzima inespecífica, degradando ligações glicosídicas envolvendo N-acetil hexosamina e ácidos D-glucurônico ou L-idurônico (Figura 9).

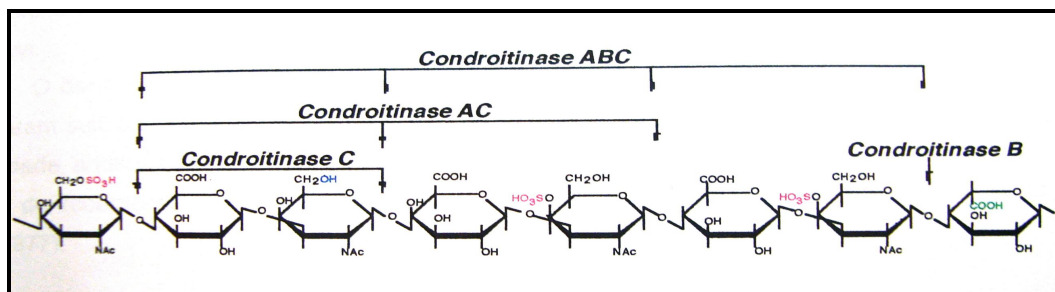


Figura 9: Mecanismo de ação das condroitinases de *Proteus vulgaris*.

A heparitinase I libera oligossacarídeos, dissacarídeo insaturado N-acetilado (Δ U-GlcNAc) e dissacarídeo insaturado N-sulfatado (Δ U-GlcNS) (Figura 11). A heparitinase II degrada heparan sulfato a dissacarídeo insaturado dissulfatado (Δ U-GlcNS,6S), dissacarídeo insaturado N-acetilado,6-sulfatado (Δ U-GlcNAc,6S), dissacarídeo insaturado N-sulfatado (Δ U-GlcNS) e alguns oligossacarídeos (Figura 11). A heparitinase II também degrada o tetrassacarídeo obtido da heparina por ação da heparinase, a um dissacarídeo insaturado trissulfatado (Δ U,2S-GlcNS,6S) e um dissacarídeo insaturado dissulfatado (Δ U-GlcNS, 6S) (Figura 10). A heparinase degrada a heparina a tetrassacarídeos e dissacarídeo insaturado trissulfatado (Δ U,2S-GlcNS,6S) (Figura 11) (TERSARIOL, 1995).

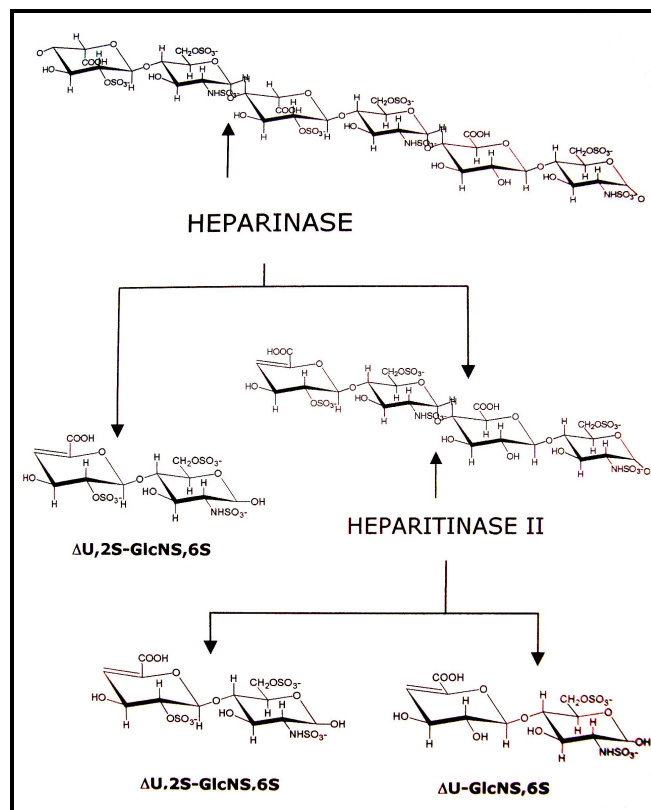


Figura 10: Mecanismo de ação da heparitinase II sobre o tetrassacarídeo sulfatado produzido pela heparinase a partir de heparina.

A condroitinase AC degrada condroitins 4- e 6-sulfato em dissacarídeos insaturados 4- e 6-sulfatados (Δ U-GalNAc,4S e Δ U-GalNAc,6S) e ácido hialurônico em dissacarídeo insaturado não sulfatado (Δ U-GlcNAc/HA). A ação da condroitinase ABC sobre o condroitim sulfato origina dissacarídeos 4- e 6-sulfatados (Δ U-GalNAc,4S e Δ U-GalNAc,6S). A ação desta mesma enzima sobre o dermatam sulfato produz dissacarídeo 4-sulfatado (Δ U-GalNAc,4S) e sobre o ácido hialurônico gera dissacarídeo não sulfatado (Δ U-GlcNAc/HA).

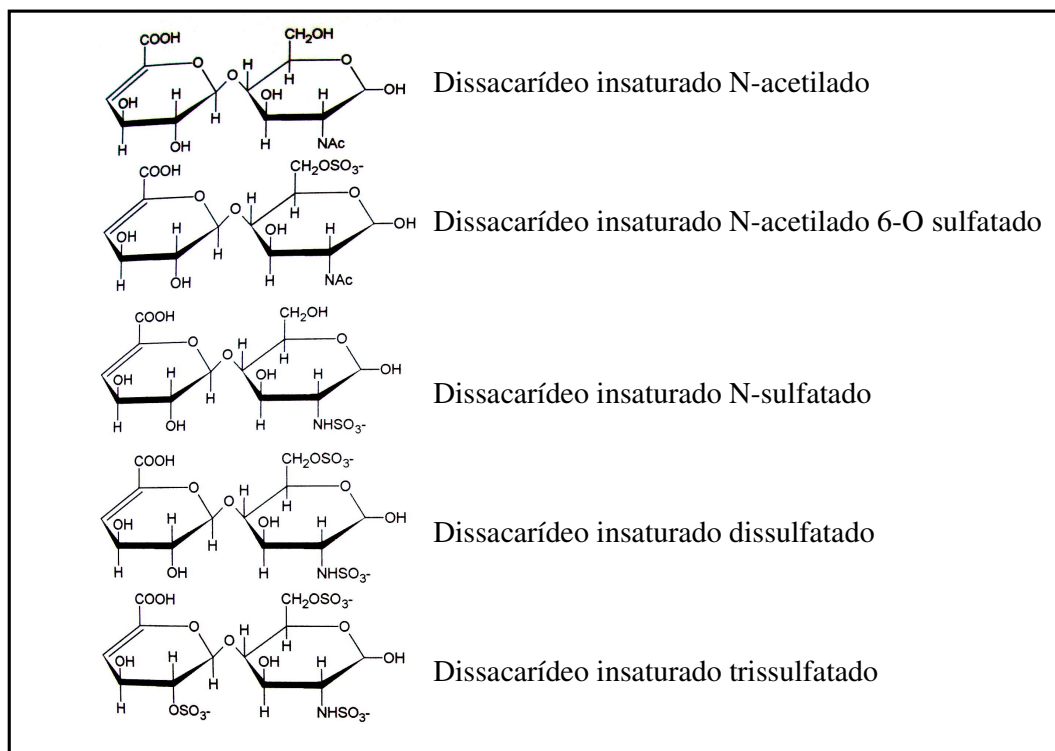


Figura 11: Estruturas dos dissacarídeos insaturados produzidos pela ação das diferentes liases de glicosaminoglicanos.

Os diferentes glicosaminoglicanos podem ser também analisados por eletroforese em gel de agarose, que permite a identificação, separando-os de acordo com o tampão utilizado. O tampão PDA (1,3-diaminopropano acetato) 0,05M, pH 9,0 distingue os compostos conforme a interação com a diamina do tampão, discriminando, por ordem decrescente de mobilidade eletroforética, os condroitim sulfatos (CS), dermatam sulfatos (DS), heparam sulfatos (HS) e heparinas (HEP). Assim, a heparina é o composto que mais interage com a diamina e apresenta a menor migração eletroforética neste tampão (DIETRICH & DIETRICH, 1976; DIETRICH et al., 1977).

O sistema descontínuo acetato de bário/PDA consiste em realizar, primeiramente, a eletroforese em gel de agarose no tampão acetato de bário por 10 minutos. Em seguida, o gel de agarose é transferido para outra câmara preparada com tampão PDA, onde permanece por 15 minutos. A seguir, é aplicada uma diferença de potencial no mesmo sentido da polaridade anterior, durante 90 minutos. Este sistema possibilita o fracionamento da heparina em pelo menos 2 componentes, um de migração

lenta (slow), que corresponde a maior peso molecular e outro de migração rápida (fast) que corresponde às frações de menor peso molecular (BIANCHINI et al., 1980).

Diversos trabalhos relatam a presença de glicosaminoglicanos sulfatados nos diferentes filos animais (Figura 12), particularmente compostos heparam sulfato e heparina-símile com atividade anticoagulante (MEDEIROS et al., 2000). A presença ubíqua de heparam sulfato em formas de vida com organização tissular e sua diversidade estrutural leva a especulação de que este composto esteja relacionado com o controle do crescimento e reconhecimento célula-célula. Condroitim sulfato também apresenta uma alta distribuição em diversas espécies.

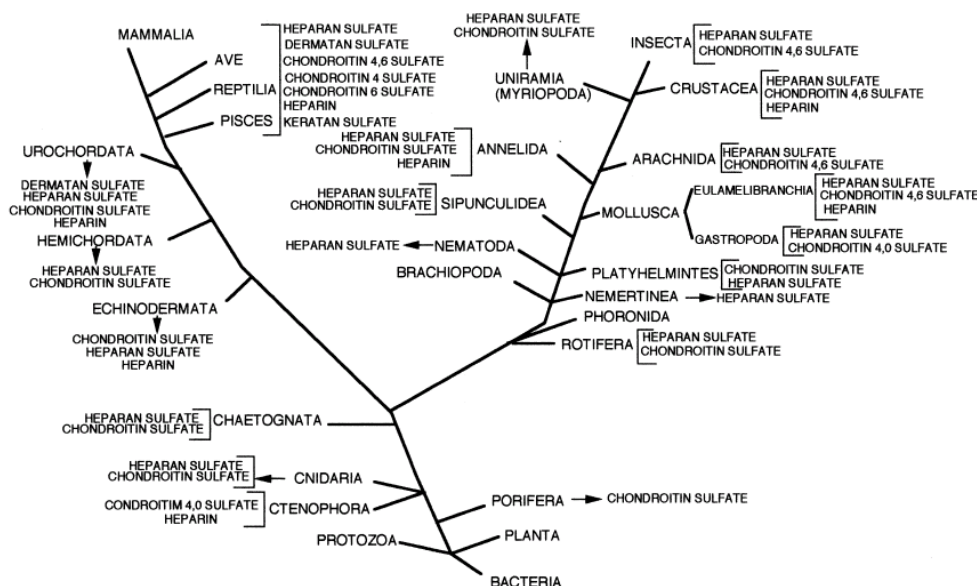


Figura 12: Árvore filogenética de distribuição de glicosaminoglicanos sulfatados no reino animal (MEDEIROS et al., 2000).

Heparans sulfato estão ausentes em protistas, plantas e fungos, a sua emergência no reino animal se dá com a dos eumetazoa, que são os animais com organização tecidual verdadeira (DREYFUSS et al., 2009). Segundo Nader et al. (1999b), estudos nesta área sugerem que heparina e heparam sulfato desempenhem a mesma função biológica em vertebrados e invertebrados. Embora alguns dos invertebrados estudados não possuam sistema de coagulação sanguínea similar ao dos mamíferos e outros vertebrados, há a presença de compostos que atuam especificamente em proteínas do sistema de coagulação (MEDEIROS et al., 2000). Tem sido especulado que a presença

de heparina em mastócitos ou células com funções análogas tenha um sentido diferente da sua ação sobre a cascata de coagulação sanguínea, devido a sua natureza extremamente aniônica, como característica possivelmente mais farmacológica do que biológica (NADER et al., 1999a).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-HAMID, A.; BAKAR, J.; BEE, G. H. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Food Chemistry, 78, 69-74, 2002.
- ALENCAR, R. B., BIONDI, M. M., PAIVA, P. M. G., VIEIRA, V. L. A., CARVALHO JR, L. B., BEZERRA, R. S. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. Brazilian Journal of Food Technology, v.6, p.279-284, 2003.
- AMARAL, I. P. G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CARVALHO JR., L. B.; BEZERRA, R. S. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. Process Biochemistry, 42, 1213-1216, 2006.
- AMARAL, I. P. G. Imobilização de tripsina de tilápia nilótica em Dacron ferromagnético: caracterização do derivado e sua aplicação na detecção de inibidores de protease. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco, 71p, 2007.
- ANDRADE, G. P. V. Heparinóides do crustáceo *Goniopsis cruentata*: estrutura, atividades farmacológicas e interação com células endoteliais. Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 150p, 2006.
- AOKI, H., AHSAN, MD.N., MATSUO, K., HAGIWARA, T. AND WATABE, S. Partial purification of proteases that are generated by processing of the Northern shrimp *Pandalus borealis* and which can tenderize beef. Int J Food Sci Technol 39, 471–480, 2004.
- ARVANITOYANNIS, I. S.; KASSAVETI, A. Fish Waste Management: Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste. In: Waste Management for the Food Industries. 2008.
- ASSIS, C.R.D., AMARAL, I.P.G., CASTRO, P.F., CARVALHO JR, L.B., BEZERRA, R.S. Effect of dichlorvos on the acetylcholinesterase from tambaqui (*Colossoma*

- macropomum*) brain. Environmental Toxicology and Chemistry, v.26, p.1451-1453, 2007.
- BABU, C. M.; CHAKRABARTI, R.; SAMBASIVARAO, K. R. S. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. LWT, 41, 227–235, 2008.
- BARBIERI JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. Camarões Marinhos (Engorda). Vol. II. Viçosa: Aprenda Fácil Editora, 370 p, 2002.
- BERTRAM, J. S.; VINE, A. L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: Independent action on a common target. Biochimica et Biophysica Acta, 1740: 170-178, 2005.
- BEZERRA, R. S. Proteases digestivas no Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). Tese Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.
- BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; LINO, M. A. S.; VIEIRA, V. L.; CARVALHO JR., L. B. Characterization of stomach and pyloric caeca proteinases of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Journal Food of Biochemistry, 24, 3, p.189-199, 2000.
- BEZERRA, R. S.; SANTOS, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JR., L. B. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Journal Food of Biochemistry, 25, 3, 199-210, 2001.
- BEZERRA, R. S., LINS, E. J. F., ALENCAR, R. B., PAIVA, P. M. G., CHAVES, M. E. C., COELHO, L. C. B. B., CARVALHO JR., L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry, v.40, p.1829-1834, 2005.
- BIANCHINI, P.; NADER, H. B.; TAKAHASHI, H. K.; OSIMA, B.; STARUSS, A. H.; DIETRICH, C. P. Fractionation and identification of heparins and other acidic

- mucopolysaccharide by a new discontinuous electroforetic method. J. Chromatogr., 196: 455-462, 1980.
- BOHNE, F., LINDEN, H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochimica et Biophysica Acta, 1579:, 25-34, 2002.
- BRITO, A. S.; ARIMATÉIA, D. S.; SOUZA, L. R.; LIMA, M. A.; SANTOS, V. O.; MEDEIROS, V. P.; FERREIRA, P. A.; SILVA, R. A.; FERREIRA, C. V.; JUSTO, G. Z.; LEITE, E. L.; ANDRADE, G. P. V.; OLIVEIRA, F. W.; NADER, H. B.; CHAVANTE, S. F. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16, 9588–9595, 2008.
- CANO-LOPEZ, A.; SIMPSON, B.K.; HAARD, N.F. Extration of carotenoprotein foram shrimp processwastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. Journal of Food Science, 52, 503-506, 1987.
- CAO, W.; ZHANG, C.; HONG, P.; JI, H.; HAO, J.; ZHANG, J. Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. LWT - Food Science and Technology, 42, 244–249, 2009.
- CHAVANTE, S. F.; SANTOS, E. A.; OLIVEIRA, F. W.; GUERRINI, M.; TORRI, G.; CASU, B.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A novel heparan sulphate with high degree of *N*-sulphation and high heparin cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. International Journal of Biological Macromolecules, 27, 49–57, 2000.
- CHEN, H.-M., MEYERS, S. P. Extraction of astaxanthin pigments from crawfish waste using a soy oil process. Journal of Food Science, 47, 892-896, 1982.
- CIRA, L.A.; HUERTA , S.; HALL, G.M.; SHIRAI, K. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp waste for chitin recovery. Process in Biochemistry, 37, 1359-1366, 2002.

- DE VECCHI, S.; COPEL, Z. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the south-west Atlantic Region – a review. *J Food Biochem*, 20: 193-214, 1996.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoresis behaviour of acid mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, 70, 645-647, 1976.
- DIETRICH, C. P.; MCDUFFIE, N. M.; SAMPAIO, L. O. Identification of acidic mucopolysaccharides by gel electrophoresis. *J. Chromatogr.*, 30, 299-304, 1977.
- DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. P.; CASTRO, R. A. B.; CHAVANTE, S. F.; JESKE, W.; FAREED, J.; GORIN, P. A. J.; MENDES, A.; NADER, H. B. Structural features and anticoagulant activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 273-283, 1999.
- DOKE, S. N.; NINJOOR, H. J. Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidases from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. *Journal of Food Science*, 52, p.1203-1208, 1987.
- DOMINGUÉZ, A.; FERREIRA, M.; COUTINHO, P.; FÁBEGRAS, J.; OTERO, A. Delivery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to aquaculture food chain. *Aquaculture*, 250: 424-430, 2005.
- DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T. R.; CAVALHEIRO, R. P.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81(3), 409-429, 2009.
- ESPÓSITO, T.S. Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Pesqueiros), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.
- FAGBENRO, O. A. Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*, 29, n.7, p.595-599, 1996.

- FAGBENRO, O. A.; BELLO-OLUSOJI, O.A. Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. *Food Chemistry*, 60, n.4, p.489-493, 1997.
- FAO. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Briggs, M. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 17 August 2006. [Cited 8 February 2010]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en. 2006.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Fisheries e Aquaculture Departament. Roma, 2007.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2007. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Fisheries e Aquaculture Departament. Roma, 2009.
- FAO/WHO. Energy and protein requirements. Rome: Food and agricultural organization of the United Nations, 1989.
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43: 228-265, 2004.
- GILDBERG, A. Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochemistry*, 28, 1-15, 1993.
- GILDBERG, A., STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36 809-812, 2001.
- HEU, M.S.; KIM, J.S.; SHAHIDI, F. Components and nutritional quality of. shrimp processing by-products. *Food Chemistry*, v.82, p. 235-242, 2003.
- HOSSAIN, M.A., ISHIHARA, T., HARA, K., OSATOMI, K., KHAN, M.D.A.A. AND NOZAKI, Y. Effect of proteolytic squid protein hydrolysate on the state of water and dehydration-induced denaturation of lizard fish myofibrillar protein. *J Agric Food Chem* 51, 4769–4774, 2003.

- HWANG, J., MIZUTA, S., YOKOYAMA, Y., YOSHINAKA, R. Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja Kenojei*). Food Chemistry, v.100, p.921- 925, 2007.
- IBAMA. Estatísticas da Pesca 2003 Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2004.
- IBAMA. Estatísticas da Pesca 2004 Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2005.
- IBAMA. Estatísticas da Pesca 2005 Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2007.
- ISLAM, M. S.; KHAN, S.; TANAKA, M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. Marine Pollution Bulletin. 49: 103 –110, 2004.
- JENSEN, P. E.; BASSI, R.; BOEKEMA, E. J.; DEKKER, J. P.; JANSSEN, S.; LEISTER, D.; ROBINSON, C.; SCHELLER, H. V. Structure, function and regulation of plant photosystem I. Biochimica et Biophysica Acta, 1767, 335-352, 2007.
- JUANG, R. S.; WU, F. C.; TSENG, R. L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes, Bioresour. Technol., 80, 187–193, 2001.
- KATALINICH, M. Characterization of chitosan films for cell culture applications. Tese Ph.D. B.S. University of Colorado, Boulder, 1997.
- KHAN, M. A. A., HOSSAIN, M. A. A., HARA, K., OSATOMI, K., TADASHI, I. AND YUKINORI, N. Effect of enzymatic fish-scrap protein hydrolysate on gel-forming ability and denaturation of lizard fish *Saurida wanieso* surimi during frozen storage. Fish Sci, 69, 1271–1280, 2003.

- KIM, J.S.; SHAHIDI, F.; HEU, M. S. Characteristics of salt-fermented sauces from shrimp processing byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 784-792, 2003.
- KRAJEWSKA, B. Applications of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126-139, 2004.
- KUMAR, M., N., V., R. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27, 2000.
- KUO, H.-C.; LEE, T.-C.; CHICHESTER C.O.; SIMPSON, K. L. The carotenoids in the deep sea red crab, *Geryon quinquedens*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 54B, p. 387-390, 1976.
- LATSCHA, T. Carotenoids in aquatic animal nutrition: their nature and significance in animal feeds. Roche Publication No. 2175, F. Hoffmann-La Roche, Animal Nutrition and Health, Basel, Switzerland. 1990.
- LEAL, A. L. G.; CASTRO, P. F.; LIMA, J. P. V.; CORREIA, E. S.; BEZERRA, R. S. Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. *Aquacult Int*, DOI 10.1007/s10499-009-9284-0. 2009.
- MACKIE, I. M. Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, 17: 26-31, 1982.
- MEDEIROS, G. F.; MENDES, A.; CASTRO, R. A. B.; BAÚ, E. C.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1475, 287-294, 2000.
- MEYERS, S. P.; LATSCHA, T. Carotenoids. In: *Crustacean Nutrition, Advances in World Aquaculture*, Volume 6. World Aquaculture Society, 1997.
- MUHLIA-ALMAZÁN, A., SÁNCHEZ-PAZ, J. A., YEPIZ-PLASCENCIA, G., PEREGRINO-URIARTE A. B. Influence of molting and starvation on the

- synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Phys. B.* 133, 383-394, 2002.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76, 167-182, 2009.
- NADER, H. B.; KOBAYASHI, E. Y.; CHAVANTE, S. F.; TERSARIOL, I. L. S.; CASTRO, R. A. B.; SHINJO, S. K.; NAGGI, A.; TORRI, G.; CASU, B.; DIETRICH, C. P. New insights on the specificity of heparin and heparan sulfate lyases from *Flavobacterium heparinum* revealed by the use of synthetic derivatives of K5 polysaccharide from *E. coli* and 2-O-desulfated heparin. *Glycoconjugate Journal*, 16, 265–270, 1999a.
- NADER, H. B.; CHAVANTE, S. F.; DOS-SANTOS, E. A.; OLIVEIRA, F. W.; DE-PAIVA, J. F.; JERÔNIMO, M. B.; MEDEIROS, G. F.; DE-ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; DE-SOUSA-FILHO, J. F.; CASTRO, R. A. B.; TOMA, L.; TERSARIOL, I. L. S.; PORCIONATTO, M. A.; DIETRICH, C. P. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 529-538, 1999b.
- NÈGRE-SADARGUES, G.; CASTILLO, R.; SEGONZAC, M. Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocatididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge. *Comp. Biochem. Phys. A.*, 127, 293-300, 2000.
- PINHEIRO, A. C. A. S. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). *Aquaculture*, 262, 17–22, 2007.
- RINAUDO M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*, 3, 603–32, 2006.
- ROCHA, I. P. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e oportunidades para 2008. *Revista da ABCC*, 2008, 4, 20-23. 2008.

- RUTTANAPORNVAREESAKUL, Y., IKEDA, M., HARA, K., OSAKO, K., KONGPUN, O. AND NOZAKI, Y. Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. *Fish Sci* 71, 220–228, 2005.
- SANTOS, S. D. Extração de pigmentos carotenóides de resíduos do processamento do camarão branco *Litopenaeus vannamei* utilizando autólise proteolítica. Recife. 66 folhas Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2006.
- SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96: 1195-1200, 2005.
- SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N. S.; MAHENDRAKAR, N. S. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26: 1092-1098, 2006.
- SAHOO, D.; SAHOO, S.; MOHANTY, P.; SASMAL, S.; NAYAK, P. L. Chitosan: a New Versatile Bio-polymer for Various Applications. *Designed Monomers and Polymers*, 12, 377–404, 2009.
- SHAHIDI, F.; METUSALACH, BROWN, J. A. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Rev. Food Sci.* 38: 1–67, 1998.
- SILVA, C. P. Composição nutricional e análise microbiológica do hidrolisado protéico de subprodutos de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*. 56 p. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, 2006.
- SOUZA, A. A. G., AMARAL, I. P. G., ESPÍRITO SANTO, A. R., CARVALHO JR, L. B., BEZERRA, R. S. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry*, v.100, p.1429-1434, 2007.
- STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740: 101-107, 2005.

- SUDARYONO, A.; TSVETNENKO, E.; EVANS, L. H. Digestibility studies on fisheries by-product based diets for *Penaeus monodon*. Aquaculture, v.143, p.331-340, 1996.
- SYNOWIECKI J. AND AL-KHATEEB N.A.A.Q. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Cragon cragon* processing discards. Journal of Food Chemistry 68: 147–152, 2000.
- TARR, H. L. A. Possibilities in developing fisheries by-products. Food Technology 2, 268-277, 1948.
- TACON, A. G. J. Produção Aquícola Global em 2005 e as estimativas da quantidade de ração utilizada. Panorama da Aquicultura. Vol. 17, nº 100, p. 24-29, 2007.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. Biomed Pharmacother 58:100–110, 2004.
- TERSARIOL, I. L. S. Seqüenciamento de heparam sulfato e mecanismo de ação da heparitinase I. Tese (doutor), Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Departamento de Bioquímica. São Paulo, 120p, 1995.
- TOMA, R.B.; JAMES, W. Nutritional evaluation of protein from shrimp cannery effluent (shrimp waste protein). Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.23, p.1168-1171, 1975.
- VELU, C. S.; CZEZUCA, B.; MUNUSWAMY, N. Carotenoprotein complexes in entomostracan crustaceans (*Streptocephalus dichotomus* and *Moina micrura*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 135: 35-42, 2003.
- ZHANG, N., YAMASHITA, Y. AND NOZAKI, Y. Effect of protein hydrolysate from Antarctic krill meat on the state of water and denaturation by dehydration of lizard fish myofibrils. Fish Sci, 68, 672–679, 2002.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estruturar um método para obtenção integrada de várias biomoléculas de cabeças de camarão submetidas a autólise enzimática.

3.2 Específicos

- Calcular o rendimento de hidrolisado protéico, carotenóides, quitina, quitosana e glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) obtidos de cabeças do camarão *Litopenaeus vannamei* autolisadas;
- Extrair e/ou produzir e purificar GAGs e quitosana a partir de precipitado protéico e cascas do camarão;
- Identificar e caracterizar GAGs através de eletroforese com diferentes tampões e analisar os produtos de degradação com liases;
- Caracterizar quitina e quitosanas purificadas por análise elementar, titulação potenciométrica, ressonância magnética de ^{13}C , espectroscopia de infravermelho e determinar o grau de desacetilação;

4. ARTIGO CIENTÍFICO:

An integrated process to the recovery bioactive molecules from shrimp processing waste

Este artigo será submetido à revista internacional “Bioresource Technology”



Qualis A2

ISSN: 0960-8524

Fator de Impacto: 4.815

Subject Classification: Bioprocesses - Optimization of bioprocess

An integrated process to the recovery bioactive molecules from shrimp processing waste

Thiago Barbosa Cahú^a, Suzan Diniz Santos^a, Aline Mendes^b, Carolina Ribeiro Córdula^b,
Suely Ferreira Chavante^c, Luiz Bezerra Carvalho Jr^a, Helena Bonciani Nader^b, Ranilson
Souza Bezerra^{a*}.

^aLaboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica and
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco,
Brazil.

^bLaboratório de Biologia Molecular, INFAR, Universidade Federal de São Paulo,
Brazil.

^cDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil.

*Author to whom the correspondence should be addressed.

Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia, Departamento de Bioquímica

Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, 50670-420, Recife, PE,
Brazil.

Tel.: +55-8121268540; Fax: 21268485

e-mail: ransoube@uol.com.br

Abstract

Shrimp processing waste is one of the most abundant byproduct generated by fishery industries. As the global shrimp aquaculture production continues to grow, since early 1990's, the amount of waste becomes an economical and environmental problem. The aim of this work was to develop a process to recovery bioactive molecules of shrimp head using autolysis. The recovery of chitin and chitosan was 25g and 17g per kg waste, respectively. Chitosans were characterized by ^{13}C -NMR, potentiometric titration, elemental analysis and FT-IR, and showed variable degrees of deacetylation between 60-80 percent. Sulfated glycosaminoglycans were also recovered and showed electrophoretic migration similar to mammalian standards. The degradation products suggest the presence of heparan sulfate with C-6 sulfatation. These data corroborates the possibility of an integrated process for isolation of highly bioactive molecules, like sulfated and amino-polysaccharides, from shrimp processing waste with a broad spectrum of applications.

Keywords: Autolysis, Chitin, Chitosan, *Litopenaeus vannamei*, Shrimp processing waste, Sulfated glycosaminoglycan.

1. Introduction

Shrimp culture production reached 3,275,726 t in 2007, and continues to be the second most important commodity traded in value terms, accounting for 16.5 percent of the total value of internationally traded fishery products (FAO, 2009). In Northeast Brazil the production of cultured crustaceans reached 63,750 t in 2006, which corresponded to approximately 98% of the amount produced in this country (IBAMA, 2007). The marine Pacific White Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) leads the Brazilian aquaculture and is one of the three most farmed shrimp species worldwide, along with *Penaeus monodon* and *P. chinensis* (FAO, 2006).

As the increase of aquacultured shrimp supplies the demand for this product, the amount of generated processing waste keeps growing as well, which represents an ecological problem. The waste of fish, mollusks and crustacean byproducts and bycatch may correspond to 20-70 percent of all commercialized fishery (Mackie, 1982).

Hydrolysis of fish and shrimp waste is a common method of treatment for these by-products and can be used in the recovery of their bioactive molecules. This method is easily adapted to industrial conditions and is not employed only for recovering of a highly nutritive protein hydrolysate (Simpson et al., 1997; Wang & Chio, 1998; Guerard et al., 2002; Mizani et al., 2005; Pacheco-Aguilar et al., 2008), but also as a step in a process to extract others bioactive molecules, such as chitin (for chitosan production) and carotenoids (Gildberg & Stenberg, 2001). The production of chitin and chitosan is environmental friendly and economically feasible, especially if it includes the recovery of carotenoids (Kumar, 2000).

The use of commercial proteases to recovery protein hydrolysate, carotenoprotein and chitin from shrimp processing waste has already been proposed (Simpson et al., 1997; Synowiecki & Al-Khateeb, 2000; Gildberg & Stenberg, 2001; Mizani et al., 2005). However, the high cost of commercial enzymes represents an economic bottleneck in the process. It is known that shrimp midgut gland (present in the cephalothorax) and fish viscera are source of digestive enzymes, such as peptidases (Buarque et al. 2009a; Bezerra et al. 2001). Therefore, the operational cost linked to the use of commercial enzymes may be reduced by replacing them by autolysis.

Shrimp head has been described as a source of high quality protein hydrolysate, chitin and chitosan (Gilberg & Stenberg, 2001; Mizani et al., 2005 Synowiecki & Al-Kahteeb, 2000), carotenoids (Babu et al., 2008; Sachindra et al., 2005; 2006), and sulfated glycosaminoglycans (Brito et al., 2008; Dietrich et al., 1999). In this work, it is described a method to recovery of protein, Ca^{2+} , chitin, carotenoids and glycosaminoglycans (GAGs) from shrimp processing waste using proteolytic endogenous enzymes. Moreover, the obtained polysaccharides were characterized.

2. Materials and Methods

2.1 Shrimp head enzymatic autolysis

Shrimp heads of the species *Litopenaeus vannamei* were provided by a local fishery processing plant (EMPAF Ltd.). Fresh heads were immediately transported to the laboratory, packed (1.0 kg) in plastic bags and stored at -20°C until use. Hydrolysis was performed according to the method of Bezerra et. al. (2005a) for *L. vannamei*, without addition of Alcalase[®]. The heads (1,0 kg) were grinded with 1,0 L of distilled water (1:1) in a domestic food processor, and then autolysis was allowed in a vessel on

water bath at 40°C for 2 h under stirring, and then heated for 10 min at 100°C. Afterwards the preparation was filtered through gauze (porosity 1mm²) to retain the carapace and the liquid phase was centrifuged for 10,000 g at 4°C. It was added 3 volumes of 500 mL 90% ethanol (v/v), to the precipitated to extract fat and carotenoids, and then the remaining sediment was lyophilized. The pigmented extract was concentrated in a flash evaporator (IKA[®] HB 05.06CN Rotary Evaporator) and ethanol was recovered for further extractions. Approximately 58.4 g of dried shrimp sediment was submitted to proteolysis with 4.0 mg/mL Maxatase (Biocon Laboratories, São Paulo, Brazil) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 with 0.15M NaCl (enzyme solution/extract ratio 10:1 mL/g) for 24 h at 60°C under stirring. Afterwards the proteins were precipitated with trichloroacetic acid, TCA (final concentration 10%), at 4°C and centrifuged at 10,000 g for 20 min.

2.2 Proteolytic activity

Protease activity of shrimp head homogenate was carried out according to Bezerra et al. (2005b). One unit (U) of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme capable of hydrolyzing azocasein to produce a 0.001 change in absorbance per minute. A comparison with 0.5% Alcalase[®] (Novozyme Brazil S.A.) was carried out in the same conditions.

2.3 Carotenoids HPLC analysis

HPLC separations were carried out using a 300 x 3.9 i.d. mm Water C18 reverse-phase column (15-20 µm - USA). Chromatographic analysis was conducted on an ÄKTA Purifier equipped with auto-sampler injector, controlled by UNICORN 4.11 software. Chromatography was isocratically performed at 23°C. Mobile phase consisted

of acetonitrile, methanol, chloroform and water; 60:25:10:5 (v/v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. The injection volume used was of 50 μ L, and the detection by light absorbance was performed at 480, 455 and 474 nm. Calibration curves were established by injecting ten increasing concentration of pure astaxanthin as standard in the HPLC mobile phase. Peak area for these carotenoids could thus be directly converted into quantity.

2.4 Preparation of chitin and chitosan

Dried carapace was treated with 1 M HCl and 1 M NaOH to remove CaCO_3 and proteins respectively. The despigmentation was performed with 0.5% (w/v) KMnO_4 and 1% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. The chitin flakes were washed with a large amount of distilled water and dried. Purified chitin was mixed to 500 mL of NaOH 50% (w/v) and incubated in a water bath at 65°C for 24 h under stirring. N-deacetylation was performed a second time under the same conditions. Chitosan was washed with distilled water until pH neutral, dried at 70°C and pulverized with an electric mill to obtain particle size lower than 250 μm . Purified chitosan was obtained as a fine powder after lyophilization through the following purification process: chitosan was solubilized in 3% (v/v) acetic acid, filtered, precipitated with 1 M NaOH until pH 11.0, neutralized to pH 7.0 and centrifuged (10,000 g, 15min 25°C).

2.5 Extraction and partial purification of glycosaminoglycans

The glycosaminoglycans present in the supernatant after TCA precipitation and centrifugation were precipitated by adding 2 volumes of methanol at -20 °C for 18 h, centrifuged (10,000 g at 4°C for 10 min), dried and resuspended in water for further analysis. The sample was previously submitted to bleaching to remove pigments. The

fraction was resuspended in water to form a 6% solution. Potassium permanganate was added in a final concentration of 1.5 mg mL⁻¹ and kept at 70°C for 30 min. After centrifugation (10,000 g at 4°C for 10 min), pH was adjusted to 10.0, added of 2.0 mg mL⁻¹ sodium sulfate and kept at room temperature for 24 h. The supernatant was centrifuged (10,000 g at 4°C for 10 min), dialyzed and lyophilized. The fraction obtained after precipitation with methanol was analyzed by electrophoresis and fractionated with increasing volumes of acetone. For this, the sample was dried and resuspended in 0.5 M NaCl to form a 5 % (w/v) solution and followed adding acetone (final concentration 30%), and kept at 4 °C for 18 h. The precipitated was collected through centrifugation 10.000 g for 20 min. Acetone was added to the supernatant to obtain different fractions, repeating this procediment until the acetone volume was 200% of initial.

2.6 NMR and FT-IR spectroscopy Analysis of Chitosan

Decoupled ¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker Avance DRX-400 spectrometer with a 5mm inverse probe. ¹³C-NMR acquisitions were performed using the following parameters: FIDRES- 0.8466 Hz, AQ- 0.5906 s, DW 15.75 s, DE- 5.5µs D1- 110 msec, D2- 3.4 msec, PL12-17dB (decoupler ¹H), waltz 16 pulse program. FT-IR spectra was measured in KBr pellets in transmission mode in a range of 4000 to 500 cm⁻¹ using FTIR Bomem MB100 spectrophotometer. The deacetylation degree (DD%) was calculated according to the ratio A₁₃₂₀/A₁₄₂₀ reported by Brugnerotto et al. (2001): DD%=100-[(A₁₃₂₀/A₁₄₂₀-0.3822)/0.03133].

2.7 Potentiometric Titration of Chitosan Solution

Chitosan was dissolved in 0.1M HCl solution, the titrant was NaOH 0.1M solution and the pH measurements were determined in a pH meter (ANALION PM608). Under continuous stirring, titrant was added until pH reached 2.0. Then, 1 mL of NaOH 0.1M was continuously added and the pH value recorded. The titration was terminated when the pH value reached 6.0. The degree of deacetylation (DD%) was determined by the formula $DD(\%) = \frac{\emptyset}{[(W-161\emptyset)/204+\emptyset]} \times 100$, $\emptyset = (N_A V_A - N_B V_E)/1000$, where N_A is the HCl concentration, V_A is the volume of solution, N_B is the concentration of NaOH, V_E is the volume of NaOH on the border of the curve and W is sample mass (Jiang et al., 2003).

2.8 Elemental Analysis

Elemental composition of chitin and chitosan samples was performed in an Carlo Erba EA 1110 elemental analyzer for C, H, S, and N. Degree of deacetylation was measured by the formula: $DD\% = [1 - ((C/N - 5.145)/6.816 - 5.145)] \times 100$ (Kasaai et al., 2000).

2.9 Electrophoresis of Glycosaminoglycans

There were used three electrophoretic systems on agarose gels with different buffers: PDA (1,3-diaminepropane acetate) buffer 0.5 M pH 9.0; Tris-acetate buffer 0.5M pH 8.0; and discontinuous barium acetate (0.5M pH 8.0)/PDA system. Samples were spotted in agarose gel (0.6%) slides in each buffer, and then subjected to electrophoresis at 5°C in a chamber. Migration was started on the negative pole because of the highly anionic charge density of the compounds. After electrophoresis, the gel was immersed in a 0.1% solution of Cetavlon (cetyltrimetilammonium bromide) for 2 h. Then the gel was dried under a lamp in a current of air from a fan. The slides were

stained with a 0.1% solution of toluidine blue in acetic acid/ethanol/water (0.1:5:5), destained with the same solution without toluidine and dried at room temperature. The quantification of GAGs was carried out by densitometry at 525 nm.

2.10 Enzymatic Degradation with Glycosaminoglycans Lyases

Some fractions were chosen to undergo enzymatic degradation with glycosaminoglycan lyases: heparitinase I, heparitinase II, a mixture of heparitinase I and II, heparinase, a mixture of heparinase and heparitinase II, chondroitinase AC and chondroitinase ABC. An amount of 100 µg of glycosaminoglycan from each fraction was incubated with 0.1 U of enzyme or enzyme combination in 0.05M ethylenediamine-acetate buffer pH 7.0 in a final volume of 30 µL and degradation was performed for 12 h at 30°C in water bath. It was used 10 mM of CaCl₂ in heparinase degradations as a co-factor for enzyme activity. The degradation products were submitted to paper chromatography on Whatman nr. 1 using isobutyric acid/1 M NH₃ 5:3 (v/v) for 24 hours. The products formed were detected by short wave UV lamp and silver nitrate staining.

3. Results and Discussion

An optimized process for utilization of shrimp processing waste submitted to autolysis was developed. It is suitable for recovery of multiple bioactive molecules, with a large array of applications. Due to no inclusion of exogenous enzymes, the process cost is greatly decreased, rendering it economically feasible for utilization in large scale. Endogenous hydrolytic enzymes are found in food biological materials. The midgut gland of penaeids is known to contain high proteolytic activity (Lemos et al., 2000). Trypsin and chymotrypsin are the most abundant proteolytic enzymes in the

midgut gland of shrimp, and are responsible for more than 60 percent of total protein digestion in penaeids (Muhlia-Almazán et al., 2002). Shrimp head homogenate protease activity was $6.76 \pm 0.8 \text{ mU min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, about twice higher than Alcalase[®] activity ($2.9 \pm 0.3 \text{ mU min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Buarque et al. (2009a and 2009b) determined the proteolytic activity in midgut gland extract from *Farfantepenaeus paulensis* and *F. subtilis* using azocasein to be $6.49 \pm 0.2 \text{ mU min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ and $11.97 \pm 0.74 \text{ mU min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectively. This information corroborates the efficacy of shrimp endogenous enzymes in hydrolyzing tissues, releasing peptides and amino acids. Other enzymes present in hepatopancreas, however, can be involved with hydrolysate composition like amylases (Le Chevalier & Van Wormhoudt, 1998) and lipases (Gamboa-Delgado et al., 2003).

Several methods are available for the recovery of chemical components from crustacean processing wastes. These methods are used to obtain protein hydrolysates, protein concentrate, carotenoids, chitin and calcium compound from shrimps, crabs, krill and lobster head waste and carapace (Peniston & Johnson, 1980; Meyers & Chen, 1985; Mikalsen & Mikalsen, 1993; Kagan & Braun, 2004). Nevertheless, these well established processes utilize crustacean waste for recovering some compounds by homogenizing and cooking these materials. Gildberg & Stenberg (2001) developed a process in which shrimp heads are hydrolysed by a commercial protease to obtain protein hydrolysate, chitin and carotenoids with improved efficacy. Tissues submitted to hydrolysis yield products with different properties and facilitate the extraction of compounds with more desirable physico-chemical characteristics and smaller amounts of chemical contaminants (Synowiecki and Al-Khateeb, 2000; Mizani et al., 2004). Thus, hydrolysis with endogenous enzymes enables not only the production of high

quality compounds, which are easily recovered through the process, but also renders it more economically viable.

Figure 1 displays the flow chart of the process to obtain protein hydrolysate and to recover chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from shrimp processing waste, besides calcium and protein concentrate from chitin purification. The first step was grinding the waste and allowing autolysis for 2 h at 40° C followed of enzyme inactivation by heating the mixture for 10 min at 100°C. The solid phase (carapace) was separated from the liquid phase by using gauze. The washings of carapace yielded a precipitate that was rich of protein (Concentrate I). Chitin was obtained after the washed carapace be demineralized, deproteinized and bleached. Chitosan was synthesized by deacetylation of chitin. The liquid phase was centrifuged yielding a supernatant with a high content of protein (protein hydrolysate) and a precipitate composed by a complex mixture of protein, lipid and liposoluble compounds, like carotenoids (caroteneprotein). From this precipitate carotenoids were extracted with ethanol. After this step, it was obtained a residual insoluble mass that GAGs were obtained after this material was submitted to a new proteolysis (Maxatase). At the end of the process it was obtained the following products: protein hydrolysate, 1.46 L (9% solution), ethanolic extract (lipid concentrate) with 43.71 g and carapace content was 53.3 g.

According to Leal et al. (2009) lyophilized *L. vannamei* head hydrolysate is composed by 43.63 percent protein with high content of essential amino acids (41.2 percent amino acids profile). Shrimp head waste is rich in protein (50-65 percent dry weight) and provide essential amino acids when used as a protein source in aqua feeds, as well in livestock and poultry diets (Mizani et al., 2005). Cao et al. (2009) prepared

protein hydrolysates from *L. vannamei* heads by autolysis that can be used as functional food ingredient or flavour enhancer. Endogenous shrimp head enzymes had a strong autolysis capacity for releasing threonine, serine, valine, isoleucine, tyrosine, histidine and tryptophan. Cavalleiro et al. (2007) and Leal et al. (2009) formulated feeds for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a replacement for fish meal with shrimp head silage powder and autolysate, respectively, with no adverse effects on growth and nutrients utilization.

After enzymatic autolysis the solubilized tissues form the liquid hydrolysate (supernatant) and the pigmented sediment is composed mainly by carotene-protein complex. Carotenoids and carotene-protein are responsible for the various colors of crustacean (Stainislaw and Britton, 2001). These compounds can be used in feed for pigmentation of salmon flesh and it is also being recognized for its vitamin-like qualities. Solvent extraction is traditionally used for carotenoid production from natural sources, mainly with organic solvents (Babu et al., 2008).

The total carotenoid in the concentrated ethanolic extract was 194.52 mg per kg of heads, of which 111.96 mg were unidentified carotenoids and 82.56 mg astaxanthin. Sachindra et al. (2006) optimized the method for extraction of carotenoids from non-hydrolyzed shrimp waste with different organic solvents. The maximum yield of carotenoids from *Penaeus indicus* was 43.9 mg per kg of waste using a mixture of isopropyl alcohol and hexane, and only 31.9 mg per kg of waste with ethanol. For commercial purposes, treatment of biological material such as krill, shrimp or crawfish waste with enzymes (e.g. chitinase or protease) has been used to digest the hard shells allowing a more efficient release of astaxanthin and its derivatives through extraction

with oil or organic solvents (Schiedt & Liaaen-Jensen, 1995). Proteolytic hydrolysis is associated with an optimized extraction of carotenoid content (Cano-Lopez et al., 1987).

Crude chitin represented an amount of 53.5 g per kg of waste (wet weight basis), and purified chitin and chitosan accounted for about 25.0 g and 17.0 g, respectively. This represents 25.92 percent of crude chitin, 12.16 percent of purified chitin and 8.26 percent recovered as chitosan in shrimp heads as a dry weight basis. Mizani et al. (2005) found about 88.0 g.kg⁻¹ of chitin for the shrimp *Penaeus semisulcatus* head waste. During shell demineralisation and deproteinization the solubilized protein and calcium carbonate can be recovered as protein concentrate and Ca²⁺ (Figure 1), respectively, as head solid waste contains about 30-35 percent of protein, whereas calcium carbonate and chitin represents the other major fractions (Peniston & Johnson, 1980; Coward-Kelly et al., 2006).

The production of chitin and chitosan is based on the treatment of crustacean carapace. In the shrimp exoskeleton, chitin is intimately associated with proteins; hence the importance of the deproteinization step in the extraction process (Teng et al., 2001). Chitin is an abundant natural structural amino polysaccharide, composed of 2-acetamido-2-deoxy- β D-glucose through β ($\rightarrow$) linkage. This polysaccharide is white, hard, inelastic, presenting low solubility, immunogenicity and chemical reactivity, like cellulose (Kumar, 2000).

Chitosan is a poly 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose constituted of β (1 $\rightarrow$ 4) linkages. Commercially, chitosan is obtained by the alkaline deacetylation of chitin from shrimp and crab shells. When the degree of deacetylation of chitin reaches about 50 percent, it becomes soluble in aqueous acidic media and is called chitosan. The

solubilization occurs by the protonation of the NH_2 function on the C-2 position of the D-glucosamine repeat unit, whereby the polysaccharide is converted in a polyelectrolyte. Chitosan is the only known pseudonatural cationic polymer, thus there can be found many applications that follow from its unique character (Rinaudo, 2006), such as in wastewater treatment, food industry, medicine, agriculture, cosmetics and biotechnology (Sahoo et al., 2009).

^{13}C NMR chitosan spectrum is showed in Figure 2 for chitosans submitted to one and two deacetylations cycles. The deacetylation process is evident, as the peak 178.8 disappears while 23.3 slightly decreases, representing $\text{C}=\text{O}$ and CH_3 of the acetyl group, respectively, indicating that deacetylation occurred. The other peaks correspond to C1 (δ 100.1 and 100.5), C2 (δ 58.8 and 57.2), C3/C5 (δ 72.8 and 71.6) (C3 and C5 peaks appear as an only signal), C4 (δ 78.7 and 78.4) and C6 (δ 63.2 and 61.1). The absence of other peaks suggests that the samples are free of impurities (Paulino et al., 2006).

Chitin and chitosan FT-IR are shown in Figure 3 and followed the characteristic profile described in the literature (Ravindra et al., 1998; Duarte et al., 2001; Paulino et al., 2006). The bands 1661 to 1671 cm^{-1} are attributed to the vibrations of the amide I band and corresponds to the amide I stretching of $\text{C}=\text{O}$. The bands observed at 3474 and 3434 cm^{-1} correspond to the vibrational stretching of the hydroxyl groups. The band at 1345 cm^{-1} corresponds to a $\text{CO}-\text{NH}$ deformation and to the CH_2 group (amide III), due to the formation of $\text{CO}-\text{NH}$ group. The sharp band at 1377 cm^{-1} corresponds to a symmetrical deformation of the CH_3 group, and at 1557 cm^{-1} corresponds to the

stretching or N–H deformation of amine II and bands of polysaccharide structures at 890 to 1156 cm^{-1} .

For chitosan, the band at 1590 cm^{-1} has a larger intensity than at 1655 cm^{-1} , which suggests effective deacetylation (Figure 4). When chitin deacetylation occurs, the band observed at 1655 cm^{-1} decreases, while a growth at 1590 cm^{-1} occurs, indicating the prevalence of NH_2 groups. The band from 1500 to 1700 cm^{-1} is stressed, indicating that there was an intensification of the peak at 1590 and a decrease at 1655 cm^{-1} , that suggesting the occurrence of deacetylation. Purified chitosan two times deacetylated presents an intensification of the peak at 1590 cm^{-1} , indicating the deacetylation efficiency (Paulino et al., 2006).

Brugnerotto et al. (2001) developed a method to measure the degree of deacetylation in chitin and chitosan using FT-IR in a selected ratio of absorbance bands, calibrated using ^1H liquid and ^{13}C CP MAS solid state NMR as absolute techniques. The absorption ratio A_{1320}/A_{1420} gave the narrower experimental error independent of the technique and state of the material. Figure 4 shows the difference between chitosans in FT-IR and A_{1320}/A_{1420} ratios. The degree of deacetylation is one of the most important properties of chitosan, as it influences the solubility (also depends of molecular weight) and reactivity, especially in comparison with chitin and cellulose (Gupta & Jabrail, 2006). Potentiometric titration is a simple method, in which chitosan is dissolved in hydrochloride acid and the solution is then titrated potentiometrically with sodium hydroxide. The difference between the two inflexion points along the abscissa corresponds to the amount of acid required to protonate the amine groups of chitosan. Jiang et al. (2003) demonstrated a formula for determination of deacetylation degree.

However, this method is limited to total soluble substances and has low accuracy. Elemental analysis can be used with samples in solid state, but accuracy is even lower and only works with pure forms. A comparison between deacetylation degrees measured by different methods is presented in Table 1.

The glycosaminoglycan content in sediment after hydrolysate centrifugation was measured by densitometry in dried agarose PDA buffer was 23.32 µg per kg of waste. Fractions purified from the glycosaminoglycan extract by acetone precipitation were submitted to electrophoresis in agarose gel with different buffer systems (Figure 5).

PDA 0.05 M pH 9.0 buffer discriminates glycosaminoglycans by structure positions of sulfate groups interaction with the diamine (chondroitin and dermatan sulfate have equal charge density but different structure, consequently different migration length). This buffer separates chondroitin sulfate from dermatan sulfate, heparan sulfate and heparin. The 0.04 M barium acetate pH 4.0/ 0.05 M diaminopropane acetate pH 9.0 discontinuous buffer separates heparin from heparan sulfate, dermatan sulfate and chondroitin sulfate. 0.06 M Tris acetate buffer pH 8.0 separates the glycosaminoglycans as a function of charge, thus, heparin has the highest migration rate in this system (Medeiros et al., 2000).

The glycosaminoglycans showed similar electrophoretic migrations to the mammalian glycosaminoglycan standards (chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparan sulfate), and all of them stained metachromatically with toluidine blue. In the discontinuous system barium-diaminopropane three fractions showed a glycosaminoglycan that migrates like the slow movement component of heparin.

The presence of sulfated glycosaminoglycans in some invertebrates has been reported (Nader et al., 1999a; Medeiros et al., 2000). These studies had shown that heparan sulfate-like and heparin-like compounds are present in many species. The ubiquitous presence of heparan sulfate in all tissue-organized life forms and its structural variability has been reported in various species and its structural variability is known to be tissue dependent (Chavante et al., 2000; Nader et al., 2004). This can lead to the speculation that these compounds may be involved in cell-cell recognition and growth control (Medeiros et al., 2000). Cássaro and Dietrich (1977) reported that the emergence of sulfated glycosaminoglycans in animalia corresponds to the emergence in tissue-organized life forms, what suggests that they might be involved in cell differentiation, adhesiveness, recognition and possible morphology.

The degradation of fractions F0.8 and F1.0 are shown in Figure 6. These fractions were extensively degraded by heparitinase II and by heparitinase I with lower specificity. Heparitinase II is a glycosaminoglycan lyase from *Flavobacterium heparinum* that acts upon heparan sulfate producing the four main types of disaccharides present in this molecule. However, the yield of Δ U-GlcNac is much lower than that obtained by action of heparitinase I. Only the combination of the two heparitinases degrades completely the heparan sulfate. The heparitinase II also acts upon the tetrasaccharides formed from heparin by heparinase to the corresponding disaccharides. Heparitinase II has a broad specificity acting preferentially upon C-6 sulfated glucosamidino-glucuronic acid linkages (Nader et al., 1999b). This data suggest that one of the major glycosaminoglycan extracted from the shrimp sediment is an heparan sulfate with high degree of sulfatation on C-6.

Dietrich et al. (1999) described a sulfated glycosaminoglycan isolated from *Peneus brasiliensis* head waste with anticoagulant activity and susceptible to heparinase and heparitinase II, similar to mammalian heparins. Despite the lack of coagulation blood system similar to the mammals and other vertebrates, this crustacean presents compounds that act specifically upon the proteins of the blood coagulation system. Chavante et al. (2000) described a novel heparan sulfate from the brine shrimp *Artemia franciscana* with structural features between heparan sulfate and heparin. Brito et al. (2008) isolated a glycosaminoglycan heparin-like from *Litopenaeus vannamei* non hydrolysed head waste with anti-inflammatory activity and reduced anti-coagulant properties. The absence of hemorrhagic activity in this compound makes it a better alternative than mammalian heparin for a possible anti-inflammatory drug. Besides, products from mammalian origin have risk of contamination for pathogens, like a prions. The use of these biomaterials represents new approaches for applications in biotechnological, biomedical and pharmaceutics areas.

Many enzymatic processes are unsuitable for industrial purposes because the high cost of enzymes. The present process carried out in pilot scale can be used for larger amounts of material like in industry reactor. The costs for heating, stirring and reagents are economically sustainable by the high value added products obtained.

4. Conclusions

A new process for utilization of shrimp waste is proposed for isolation of high quality bioactive molecules. Protein hydrolysate and carotenoids can be used for formulation not only of animal feed but also in human food and cosmetic compositions. Moreover, additional protein can be recovered from shell deproteinization as a protein

concentrate during chitin purification. Chitosans with different degree of deacetylation were obtained and glycosaminoglycans present in shrimp autolysis sediment were obtained. Published data suggests that these natural polysaccharides have great potential for a large array of application in biomedicine and pharmaceuticals.

Acknowledgments

This work was financially supported by CNPq and FACEPE. The authors would like to thank EMPAF Ltda. for providing the shrimp heads.

References

- Babu, C. M.; Chakrabarti, R.; Sambasivarao, K. R. S. 2008. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT*, 41, 227–235.
- Bezerra, R. S.; Santos, J. F.; Paiva, P. M. G.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Vieira, V. L. A.; Carvalho Jr., L. B. 2001. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal Food of Biochemistry*, 25, 3, 199-210.
- Bezerra, R. S.; Abadie-Guedes, R.; Melo, F. R.; Paiva, A.M.; Amâncio-Dos-Santos, A.; Guedes, R. C. 2005a. Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression. *Neuroscience Letters*, 391, 51–55.

Bezerra, R. S., Lins, E. J. F., Alencar, R. B., Paiva, P. M. G., Chaves, M. E. C., Coelho, L. C. B. B., Carvalho Jr., L. B. 2005b. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process Biochemistry, v.40, p.1829-1834.

Brito, A. S.; Arimatéia, D. S.; Souza, L. R.; Lima, M. A.; Santos, V. O.; Medeiros, V. P.; Ferreira, P. A.; Silva, R. A.; Ferreira, C. V.; Justo, G. Z.; Leite, E. L.; Andrade, G. P. V.; Oliveira, F. W.; Nader, H. B.; Chavante, S. F. 2008. Anti-inflammatory properties of a heparin-like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16, 9588–9595.

Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F.M.; Argüelles-Monal, C.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer, 42, 3569-3580.

Buarque, D. S.; Castro, P. F.; Santos, F. M. S.; Lemos, D.; Carvalho Júnior, L. B.; Bezerra, R. S. 2009a. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture Research, 40, 861-870.

Buarque, D. S.; Castro, P. F.; Santos, F. M. S.; Amaral, I. P. G.; Oliveira, S. M.; Alves, K. B.; Carvalho Júnior, L. B.; Bezerra, R. S. 2009b. Digestive proteinases and peptidases in the hepatopancreas of the southern Brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) in two sub-adult stages. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009.00673.x.

Cano-Lopez, A.; Simpson B. K.; Haard N. F. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. J. Food. Sci. n. 52, p. 503-506.

Cao, W.; Zhang, C.; Hong, P.; Ji, H.; Hao, J.; Zhang, J. 2009. Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. LWT - Food Science and Technology, 42, 244–249.

Cássaro, C. M. F.; Dietrich, C. P. 1977. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. The Journal of Biological Chemistry, 252, 7, 2254-2261.

Cavalheiro, J. M. O., Souza, E. O., Bora, P. S. 2007. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) feed. Bioresour. Technol., 98, 3, 602-606.

Coward-Kelly, G.; Agbogbo, F. K.; Holtzapple, M. T. 2006. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. Bioresource Technology, 97, 1515–1520.

Chavante, S. F.; Santos, E. A.; Oliveira, F. W.; Guerrini, M.; Torri, G.; Casu, B.; Dietrich, C. P.; Nader, H. B. 2000. A novel heparan sulphate with high degree of *N*-sulphation and high heparin cofactor-II activity from the brine shrimp *Artemia franciscana*. International Journal of Biological Macromolecules, 27, 49–57.

Dietrich, C. P.; Paiva, J. P.; Castro, R. A. B.; Chavante, S. F.; Jeske, W.; Fareed, J.; Gorin, P. A. J.; Mendes, A.; Nader, H. B. 1999. Structural features and anticoagulant

activities of a novel natural low molecular weight heparin from the shrimp *Penaeus brasiliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 273-283.

Duarte, M. L.; Ferreira, M. C.; Marvão, M. R.; Rocha, J. 2002. An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 1–8.

FAO. 2004. Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok.

FAO. 2006. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Briggs, M. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 17 August 2006. [Cited 8 February 2010]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en.

FAO. 2007. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Fisheries e Aquaculture Departament. Rome.

FAO. 2009 The State of World Fisheries and Aquaculture 2007. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Fisheries e Aquaculture Departament. Rome.

Gamboa-Delgado, J.; Molina-Poveda, C.; Cahu, C. 2003. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquaculture Research*, 34, 1403-1411.

Gildberg, A., Stenberg, E. 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36 809-812.

Guerard, F.; Guimas, L.; Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20, 489–498.

Gupta, K. C.; Jabrail, F. H. 2006. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 66, 43–54.

IBAMA. Estatísticas da Pesca 2005 Brasil Grandes Regiões e Unidades da Federação. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2007.

Islam, M. S.; Khanb, S.; Tanaka, M. 2004 Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. *Marine Pollution Bulletin*. 49: 103 –110.

Jiang, X.; Chen, L.; Zhong, W. 2003. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 54, 457–463.

Kagan, M.; Braun, S. 2004. Processes for extracting carotenoids and for preparing feed materials. US Patent, 6 818 239 B2.

Kasaai, M. R., Arul, J., & Charlet, G. 2000. Intrinsic viscosity–molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science and Polymer Physics*, 38, 2591–2598.

Kumar, M., N., V., R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1–27.

Le Chevalier, P.; Van Wormhoudt, 1998. A. Alpha glucosidase from the hepatopancreas of the shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Experimental Zoology*, 280, 384-394.

Leal, A. L. G.; Castro, P. F.; Lima, J. P. V.; Correia, E. S.; Bezerra, R. S. 2009. Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. *Aquacult Int*, DOI 10.1007/s10499-009-9284-0.

Lemos, D., Ezquerro, J. M., García-Carreño, F. L., 2000. Protein digestion in penaid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Comp. Biochem. Phys. B*. 186, 89-105.

Mackie, I. M. 1982. Fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, 17, 26-31.

Medeiros, G. F.; Mendes, A.; Castro, R. A. B.; Baú, E. C.; Nader, H. B.; Dietrich, C. P. 2000. Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1475, 287-294.

Meyers, S. P.; Chen, H.-M. 1985. Process for the utilization of shellfish waste. US Patent, 4 505 936.

Mikalsen, G.; Mikalsen, E. 1993. Method for recovery and separation of chitin, proteins and astaxanthin, and esters thereof. US Patent, 5 210 186.

Mizani, M.; Aminlari, M.; Khodabandeh, M. 2005. An Effective Method for Producing a Nutritive Protein Extract Powder from Shrimp-head Waste. Food Sci Tech Int, 11(1), 049–6.

Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, J. A., Yepiz-Plascencia, G., Peregrino-Uriarte A.B., 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Phys. B. 133, 383-394.

Nader, H. B.; Chavante, S. F.; dos-Santos, E. A.; Oliveira, F. W.; de-Paiva, J. F.; Jerônimo, M. B.; Medeiros, G. F.; de-Abreu, L. R. D.; Leite, E. L.; de-Sousa-Filho, J. F.; Castro, R. A. B.; Toma, L.; Tersariol, I. L. S.; Porcionatto, M. A.; Dietrich, C. P. 1999a. Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 32, 529-538.

Nader, H. B.; Kobayashi, E. Y.; Chavante, S. F.; Tersariol, I. L. S.; Castro, R. A. B.; Shinjo, S. K.; Naggi, A.; Torri, G.; Casu, B.; Dietrich, C. P. 1999b. New insights on the specificity of heparin and heparan sulfate lyases from *Flavobacterium heparinum*

revealed by the use of synthetic derivatives of K5 polysaccharide from *E. coli* and 2-O-desulfated heparin. **Glycoconjugate Journal**, 16, 265–270.

Nader, H. B.; Lopes, C. C.; Rocha, H. A. O.; Santos, E. A.; Dietrich, C. P. 2004. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. *Current Pharmaceutical Design*, 10, 9, 951-966.

Pacheco-Aguilar, M.; Mazorra-Manzano, M. A.; Ramírez-Suárez, J. C. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109, 782–789.

Paulino, A. T.; Simionato, J. I.; Garcia, J. C.; Nozaki, J. 2006. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 98–103.

Peniston, Q. P.; Johnson, E. L. 1980. Process for the recovery of chemicals from the shells of crustacea. US Patent, 4 199 496.

Ravindra, R.; Krovvidi, K. R.; Khan, A. A. 1998. Solubility parameter of chitin and chitosan. *Carbohydr Polym*, 36, 121–7.

Rinaudo M. 2006. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*, 3, 603–32.

Sachindra, N. M.; Bhaskar, N.; Mahendrakar, N. S. 2005. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *J. Sci. Food Agri*. 85, 167–172.

Sachindra, N. M.; Bhaskar, N.; Mahendrakar, N. S. 2006. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. *Waste Management*, 26: 1092-1098.

Sahoo, D.; Sahoo, S.; Mohanty, P.; Sasmal, S.; Nayak, P. L. 2009. Chitosan: a New Versatile Bio-polymer for Various Applications. *Designed Monomers and Polymers*, 12, 377–404.

Schiedt, K.; Liaaen-Jensen, S. Isolation and analysis. 1995. In. Britton, G.; Pfander, H.; Liaaen-Jensen, S. Vol: 1 A, Isolation and analysis. ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p. 81-108.

Simpson, B. K.; Nayeri, G.; Yaylayan, V.; Ashie, I. N. A. 1997. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chemistry*, 61, 1/2, 131-138,

Stainislaw, K., Britton G., 2001. A study of protein-carotenoid interactions in the astaxanthin-protein crustacyanin by absorption and Stark spectroscopy; evidence for the presence of three spectrally distinct species. *Biochim. Biophys. Acta*. 1544, 301- 310.

Synowiecki J. and Al-Khateeb N.A.A.Q. 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Journal of Food Chemistry* 68: 147–152.

Teng, W. L.; Khor, E.; Tan, T. K.; Lim, L. Y.; Tan, S. C. 2001. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*, 332, 305–316.

Wang, S-. L.; Chio, S-. H. 1998. Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme and Microbial Technology* 22:629–633.

Figure Captions

Figure 1: Scheme for utilization of shrimp head waste for recovery of biomolecules.

Figure 2: ^{13}C NMR acquisitions of chitosan one fold and two fold deacetyled, using 50% (w/v) NaOH at 65°C for 20 h. Carbons peaks are represented for the atoms present in the N-(acetyl)-glucosamine structure. Peak 178.8 disappears while 23.3 slightly decreases, representing C=O and CH₃ of the acetyl group respectively, indicating that deacetylation occurred.

Figure 3: FT-IR of chitin (1) and chitosan (2).

Figure 4: FT-IR of chitosan 1 fold deacetyled (1), 2 fold deacetyled (2) and purified chitosan (3).

Figure 5: Electrophoresis of glycosaminoglycans extracted from shrimp waste. A- Propylene diamine acetate (PDA) buffer 0.05 M pH 9.0; B-Tris acetate 0.05 M pH 8.0; C-Discontinuous barium acetate 0.04 M pH 4.0/PDA buffer.

Figure 6: Paper chromatography analysis of the products formed through action of heparitinases I and II, heparinase, chondroitinases AC and ABC and mixture of enzymes in 1,2-diaminoethane acetate pH 7.0 in a final volume of 30 μL for 18 h at 30°C. Aliquots (20 μL) of the incubation mixtures were applied to Whatman No. 1 paper and subjected to descending chromatography in isobutyric acid:1 M NH₃, 5:3, v/v for 36 h. The products were identified after silver nitrate staining. $\Delta\text{U}, 2\text{S-GlcNS}, 6\text{S}$, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid 2-sulfate)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-sulfamino-D-glucose 6-sulfate; $\Delta\text{U-GlcNS}, 6\text{S}$, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-sulfamino-D-glucose 6-sulfate ; ΔUGlcNS , O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic

acid)-(1→4)-2-sulfamino-D-glucose; Δ U-GlcNAc,6S, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid)-(1→4)-2-acetamido-D-glucose 6-sulfate; Δ U-GlcNAc, O-(4-deoxy-hex-4-enopyranosyluronic acid)-(1→4)-2-acetamido-D-glucose.

Tables

Table 1:Yield of all compounds isolated from 1.0 kg of shrimp head waste (205.5 g dwb)

Products	Yield (dwb*)	Properties	Application
Hydrolysate ²	45.6 g	High protein quality and sugar content, source of essential amino acids	Animal feed supplementation, substitution for fish protein and feed flavour
Carotenoids	194.52 mg	Natural pigments, Pro-vitamin A activity	Fish flesh pigmentation and feed supplementation;
Astaxanthin	82.56 mg	Antioxidant, antitumor	Anticancer
Chitin ³	25.0 g	N-acetylglucosamine, insoluble, biodegradable, nontoxic, physiological inertness, affinity to proteins,	Lectin affinity chromatography, biosensor, enzyme and cell immobilization, films, wound dressing material.
Chitosan ³	17.0 g	Cationic, acid soluble, non toxic, biodegradable, biocompatible, renewable, film forming, hydrating agent, nontoxic, antimicrobial, wound healing properties, hydrolyzed by lysozyme, complexes with metals.	Food coating, Removal of metal ions, binds lipids, antitumoral, hemostatic , anticoagulant, bacteriostatic, surgical sutures, artificial skin, rebuilding of bone, controlled drug delivery, encapsulating material.
Glycosaminoglycans	23.32 µg	Heparan sulfate-like and heparin-like, anticoagulant, antithrombotic, cofactor II activity	New anticoagulant, antiinflammatory, anti hemorrhagic drugs

*Dry weight basis

¹Weight of shrimp head from 1 kg wet weight

²Dry matter from a 3% solution

³Obtained from 53.3 g of carapace.

Table 2: Comparson of calculated degree of deacetylation using diferent methods (%)

	FT-IR	Elemental Analysis	Potentiometric Titration
Chitosan 1X	66.89	53	60
Chitosan 2X	79.61	69	69
Purified Chitosan	77.44	72	80

Figures

Figure 1

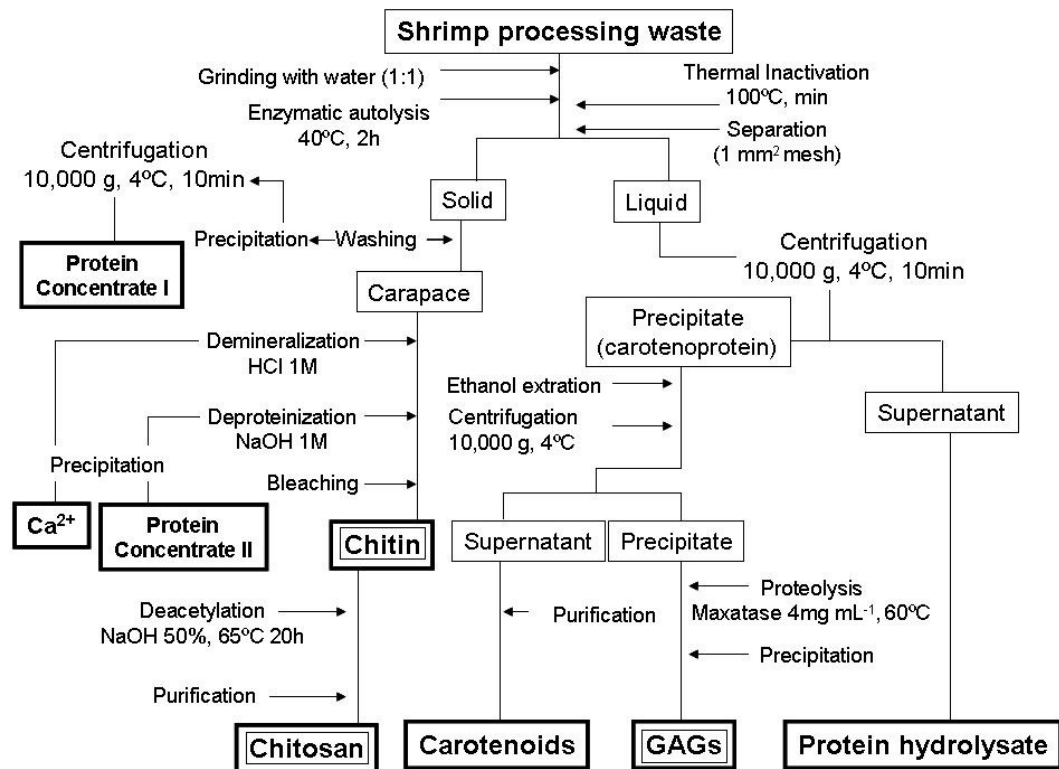


Figure2

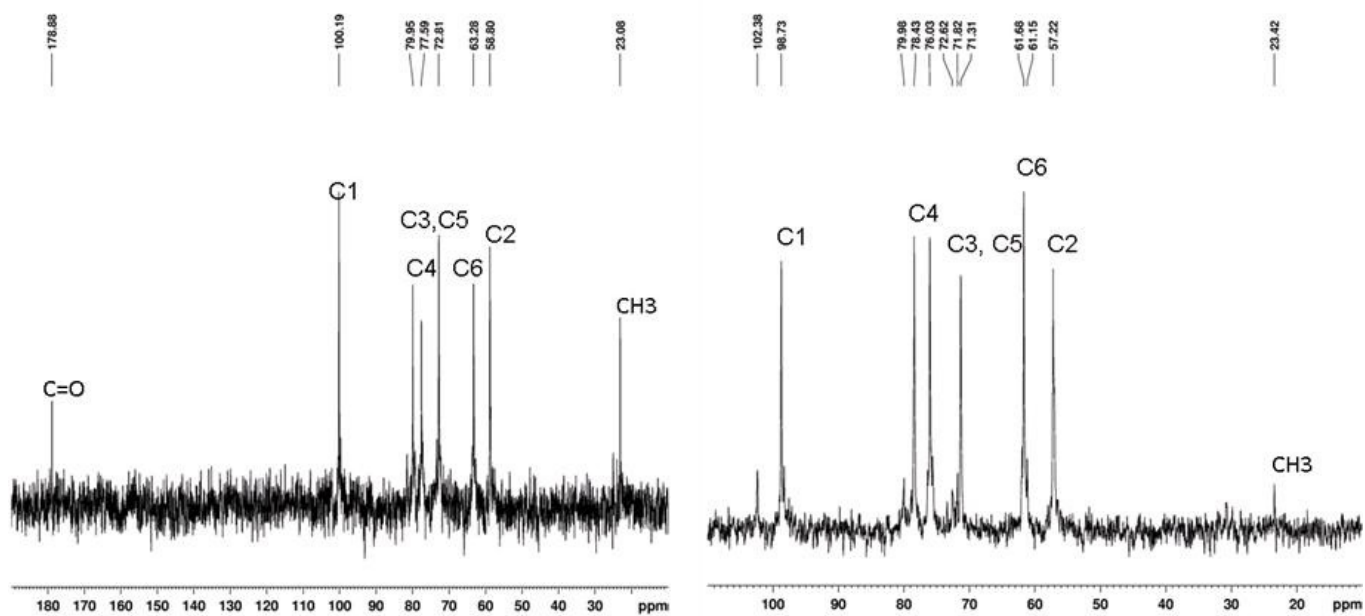


Figure 3

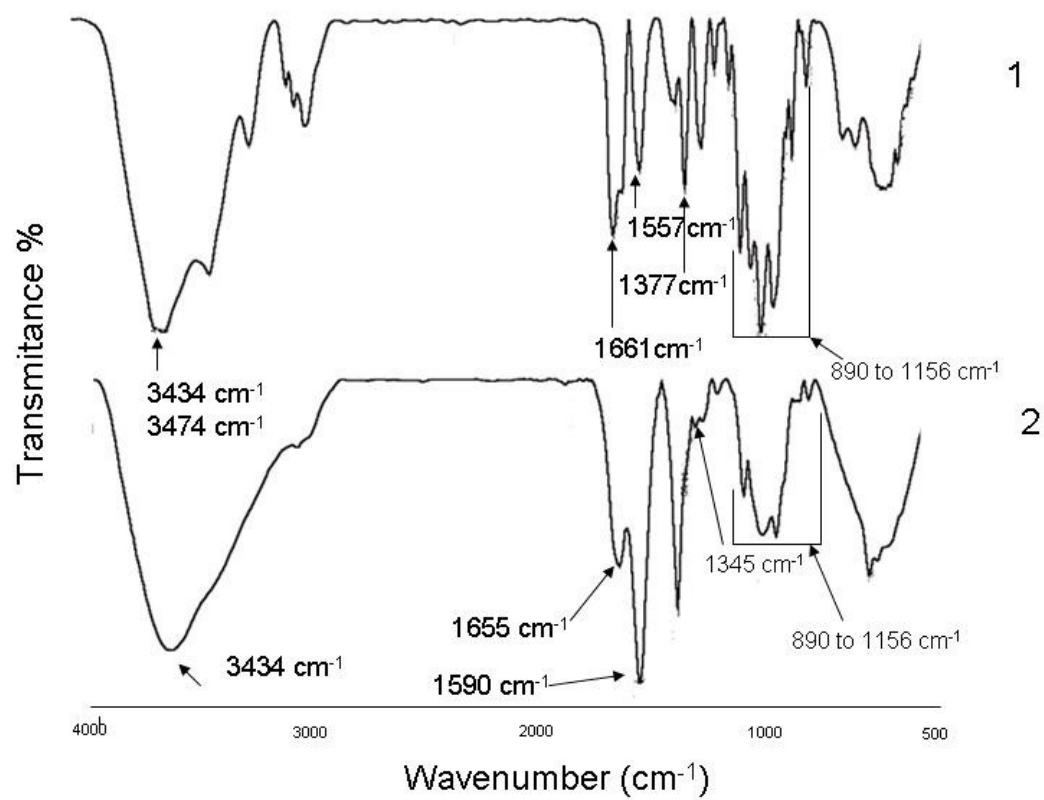


Figure 4

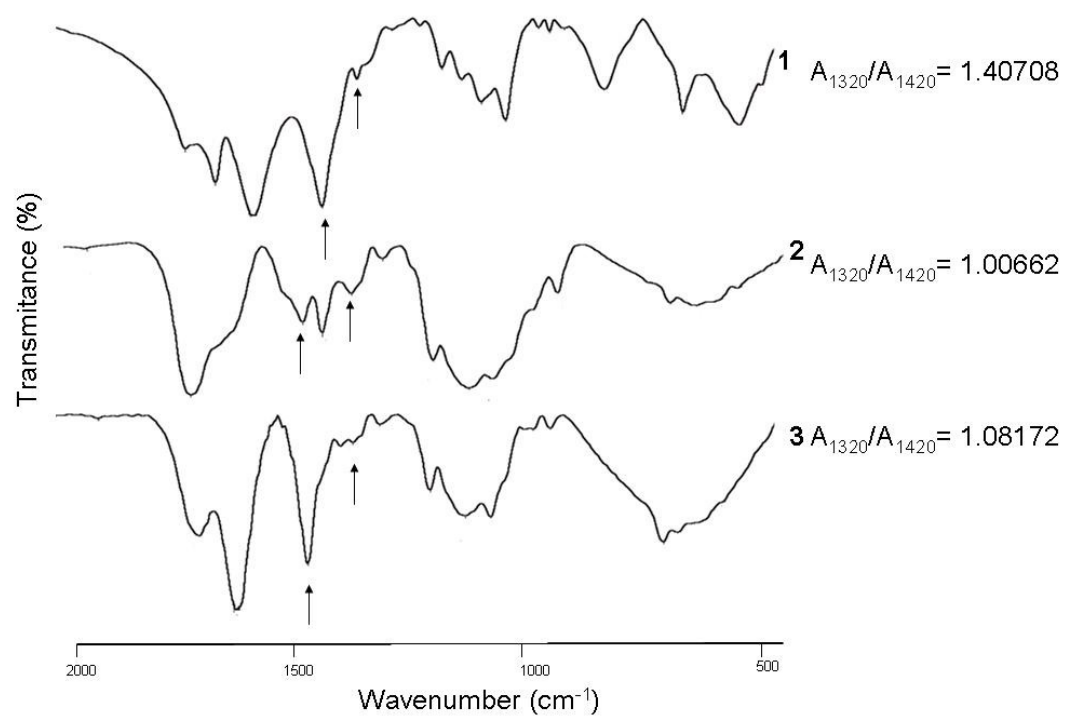


Figure 5

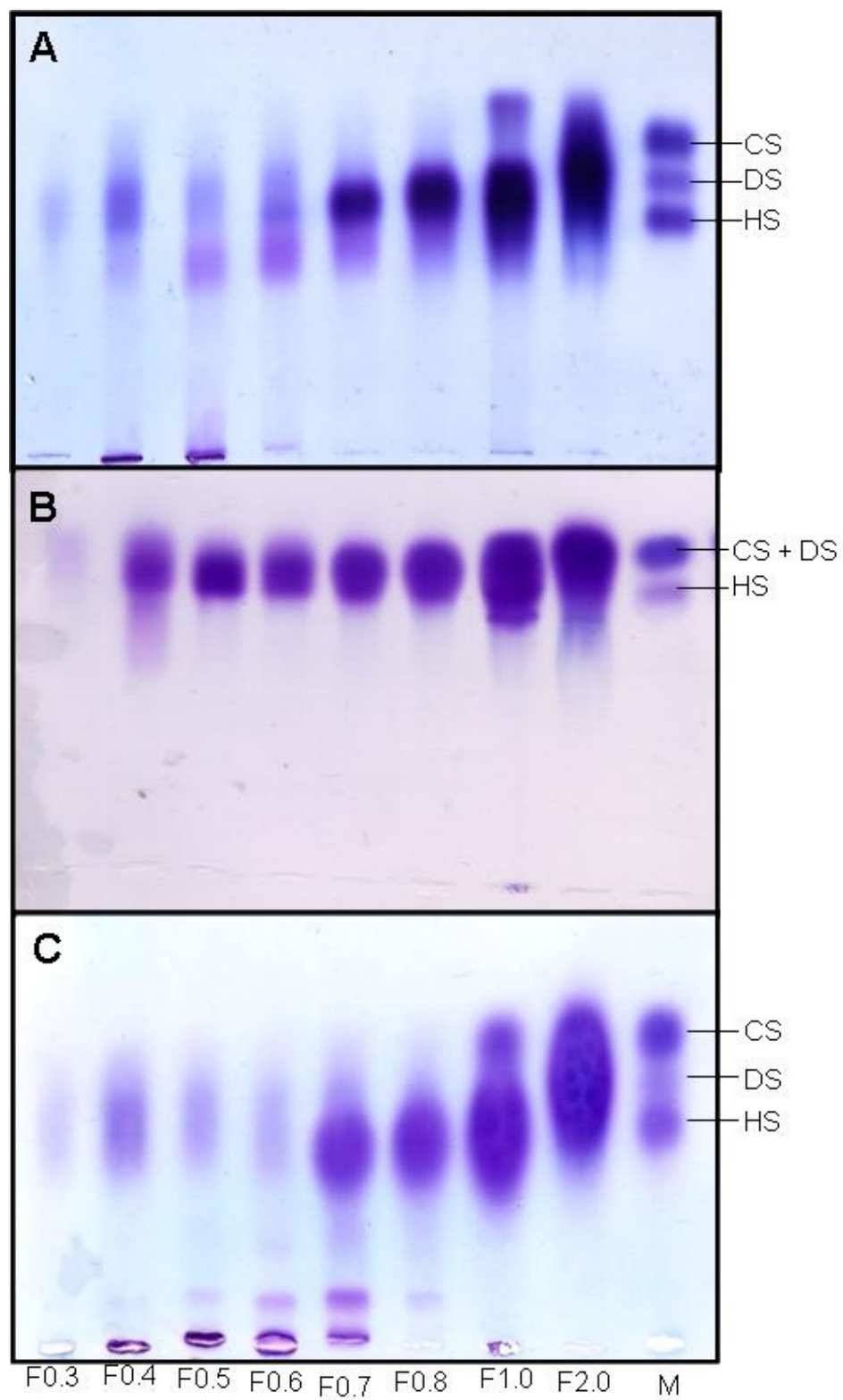
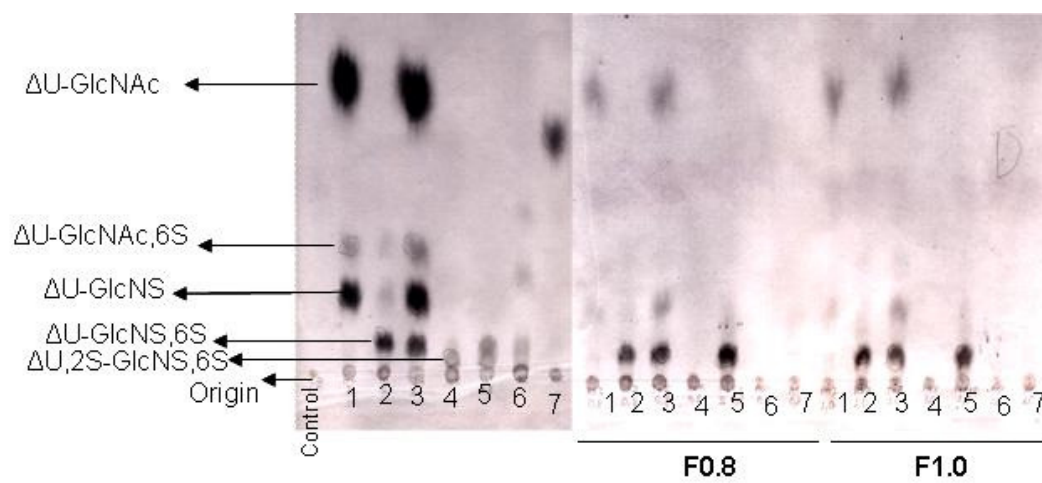


Figure 6



5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho descrevem um novo método para obtenção de biomoléculas de cabeças de camarão. Um hidrolisado protéico com alto conteúdo de proteínas e aminoácidos essenciais foi obtido, que pode ser aplicado na substituição de farinha animal em formulações e como flavour de rações e alto conteúdo de carotenóides como a astaxantina podem também ser recuperados. Quitina e quitosana foram obtidas com sucesso em etapas simples que podem representar uma economia adicional na produção destas biomoléculas. Glicosaminoglicanos sulfatados extraídos mostraram características similares ao de mamífero. Mais estudos são necessários para a verificação das propriedades biológicas e possíveis aplicações. Proteína adicional e cálcio na forma de CaCO_3 podem ser recuperados a partir do tratamento das carapaças.

6. ANEXOS

Normas para redação de artigos científicos para a revista “Bioresource Technology”:



Guide for Authors

Submission of papers:

Papers from all over the World: Please use Elsevier's online submission system to submit to the journal. The direct link is <http://ees.elsevier.com/bite/>. Authors may choose among Dr. Ashok Pandey, Dr. Christian Larroche and Dr. Steve Ricke

Covering letter to the editor:

When submitting the manuscript, it is mandatory to include a covering letter to the editor. The covering letter must state:

- (1) Subject Classification selected from the list (see guide for authors).
- (2) That all the authors mutually agree that it should be submitted to BITE.
- (3) It is the original work of the authors.
- (4) That the manuscript was not previously submitted to BITE.
- (5) State the novelty in results/ findings, or significance of results.

Submission language: English (Link to the Oxford English Dictionary <http://dictionary.oed.com/entrance.dtl>)

English language help service: Upon request Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Types of contributions: Original research papers, review articles, case studies, short communications, book reviews.

Review articles would be generally solicited by the editors from the experts. However, these can be contributed by others also. In this case, authors must consult the editor with an extended summary and outline before preparing the article.

Corresponding author: Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Original material: Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Editor's requirements: Nucleotide or protein sequences should be deposited in a publicly available database such as Genbank or EMBL before a manuscript is submitted for review in the journal. Accession numbers must be obtained and included in the manuscript before it is fully accepted for publication by the editor.

Detailed instructions on manuscript preparation and artwork instructions can be found below. The editor reserves the right to return manuscripts that do not conform to the instructions for manuscript preparation and artwork instruction, as well as paper that do not fit the scope of the journal, prior to refereeing.

If at the time you submit your manuscript for review to *Bioresource Technology*, you also have other manuscripts in review (with other journals) that are similar to, or are pertinent to your *Bioresource Technology* manuscript, please send a copy of these manuscripts to the relevant handling editor, so that they may be able to conduct a full review on your *Bioresource Technology* manuscript.

Manuscript Preparation:

General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity. Please use Word, Word Perfect or LaTeX files for the text of your manuscript. (For further information about LaTeX submission, please go to <http://www.elsevier.com/locate/latex>.)

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 12, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

Corresponding author:

Clearly indicate who is responsible for correspondence at all stages of refereeing and publication, including post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Please consult a recent journal paper for style if possible.

Abstract:

Each paper should be provided with an Abstract of about 100-150 words, reporting concisely on the purpose and results of the paper.

Keywords: Immediately after the abstract, provide a maximum of five keywords (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible.

Symbols:

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), '%' and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Units:

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and must not be used.

Maths:

Authors should make clear any symbols (e.g. Greek characters, vectors, etc.) which may be confused with ordinary letters or characters. Duplicated use of symbols should be avoided where this may be misleading. Symbols should be defined as they arise in the text and separate Nomenclature should also be supplied.

References:

All publications cited in the text should be presented in a list of references (maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively) following the text of the manuscript.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Colour Costs and Queries:

For colour illustrations, a colour printing fee is charged to the author per colour unit. Further information concerning colour illustrations and costs is available from Author Support at authorsupport@elsevier.ie, and at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>.

FREE ONLINE COLOUR

If, together with your accepted article, you submit usable colour and black/white figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. 'Usable' means the formats comply with our instructions. See the information about Illustrations at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork>. For colour illustrations in the print journal see Colour Costs above.

Tables:

Tables should be numbered consecutively and given suitable captions and each table should begin on a new page. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (for example, in graphs). Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6.

Figures:

Please make sure that figure files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6.

Conclusions:

State here the inferences drawn from the results, preferably in running text form, in maximum 100 words. No results should be given here.

Electronic Annexes

We strongly encourage you to submit electronic annexes, such as short videos, computer-enhanced images, audio clips and large databases. Please refer to the Artwork Instructions (Multimedia files) at <http://authors.elsevier.com/locate/authorartwork> for details on file types to be used. If you are submitting on hardcopy, please supply 3 disks/CD ROMs containing the electronic annex to the editor for review. In the text of your article you may wish to refer to the annex. This is not mandatory, however, if you do wish to refer to the annex in the text then please do so using this example: "?see Electronic Annex 1 in the online version of this article." Production will insert the relevant URL at the typesetting stage after this statement.

Notification:

Authors will be notified of the acceptance of their paper by the editor. The Publisher will also send a notification of receipt of the paper in production.

Copyright:

All authors must sign the Transfer of Copyright agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the authors' proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including

reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

For more information please go to our copyright page <http://www.elsevier.com/copyright>

PDF Proofs:

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. The corrections should be returned within 48 hours. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely the author's responsibility. Any queries should be answered in full. Please correct factual errors only, or errors introduced by typesetting.

For more information on proofreading please go to our proofreading page <http://authors.elsevier.com/quickguide>. Please note that once your paper has been proofed we publish the identical paper online as in print.

Author Benefits:

No page charges: Publication in this journal is free of charge.

Free offprints: The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author discount: Contributors to Elsevier journals are entitled to a 30% discount on all Elsevier books. See <http://www.elsevier.com/homepage/booksbutler> for more information.

Online Paper Tracking:

Authors can track the status of their accepted paper online at <http://authors.elsevier.com> using the reference supplied by the Publisher.

Subject Classification For Bioresource Technology

10.000 BIOCATALYSIS

10.010 Enzyme

10.020 Kinetics

10.030 Media for biocatalysts

10.040 Microbial

10.050 Protein engineering

20.000 BIOLOGICAL WASTE TREATMENT

- 20.010 Activated sludge
- 20.020 Aerobic digestion
- 20.030 Anaerobic digestion
- 20.040 Biodegradation of toxic compounds
- 20.050 Biofiltration
- 20.060 Biological nutrients removal
- 20.070 Bioremediation
- 20.080 Biosorption of heavy metals
- 20.090 Constructed wetlands for industrial effluents
- 20.100 Environmental bioengineering
- 20.110 Membrane technology
- 20.120 Phytoremediation of wastewaters
- 20.130 Biotreatment of food, dye and textile industry effluents
- 20.140 Solid waste management

30.000 BIOFUELS

- 30.010 Biodiesel production
- 30.020 Bioethanol production
- 30.030 Biogas production
- 30.040 Biohydrogen production
- 30.050 Energy and Greenhouse gas balances of biofuels
- 30.060 Life cycle assessment of biofuels
- 30.070 Microbial fuel cells
- 30.080 Modelling

40.000 BIOMASS & FEEDSTOCK UTILIZATION

- 40.010 Bioconversion of biomass: cellulose/lignocellulose
- 40.020 Composting (production)
- 40.030 Enzymatic pulping
- 40.040 Municipal wastes
- 40.050 Vermicomposting (production)

50.000 BIOPROCESSES

- 50.010 Bioleaching
- 50.020 Bioseparation
- 50.030 Design and operation of bioreactors
- 50.040 Heat & mass transfer effects
- 50.050 Kinetics
- 50.060 Modeling
- 50.070 Optimization of bioprocess
- 50.080 Solid-state fermentation
- 50.090 Submerged fermentation

60.000 MICROBIAL PRODUCTS

- 60.010 Biofertilizers
- 60.020 Biopesticides
- 60.030 Biopolymers
- 60.040 Biosurfactants

60.050 Enzymes & other proteins
60.060 Mushrooms
60.070 Organic acids
60.080 Other metabolites and products
60.090 Secondary metabolites

70.000 PHYSICO-CHEMICAL & THERMO-CHEMICAL PROCESSES FOR BIOMASS

70.010 Catalysis
70.020 Combustion
70.030 Gasification
70.040 Other thermo-chemical processes
70.050 Pretreatment for further processing
70.060 Pulping
70.070 Pyrolysis
70.080 Steam explosion

Ata da defesa

304

Ata da defesa de dissertação do mestrando **Thiago Barbosa Cahú**, realizada em 24 de fevereiro de 2010, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Às 14:00 horas, do dia 24 de fevereiro de 2010, foi aberto no Auditório Prof. Marcionilo Lins – Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação do mestrando **Thiago Barbosa Cahú**, aluno do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima (Coordenadora do Programa supra citado) fez a apresentação do aluno, do orientador Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Ranilson de Souza Bezerra, na qualidade de Presidente, Maria das Graças Carneiro da Cunha, Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, ambos do Depto. de Bioquímica da UFPE e Dário Inácio Alves Teixeira, da UFRN. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Novo Método para obtenção de proteínas, cálcio, quitina, carotenóides e glicosaminoglicanos de cabeças de camarão"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O aluno procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação do mestrando, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra para o Prof. Dr. Dário Inácio Alves Teixeira, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Daí o Sr. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, o Sr. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários, deu algumas sugestões e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Continuando os trabalhos, o Sr. Presidente na qualidade de orientador, usou da palavra para tecer alguns comentários a respeito do trabalho do aluno e agradeceu a Banca Examinadora. Finalmente a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria da Pós-Graduação. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovado"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 24 de fevereiro de 2010.

Thiago Barbosa Cahú
Ranilson de Souza Bezerra
Maria das Graças Carneiro da Cunha
Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão
Dário Inácio Alves Teixeira