



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE OLIGOSSACARÍDEOS DE
QUITOSANA OBTIDOS A PARTIR DOS RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

MILENA MARCIA DA SILVA

RECIFE

2015

MILENA MARCIA DA SILVA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE OLIGOSSACARÍDEOS DE
QUITOSANA OBTIDOS A PARTIR DOS RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

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

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientador: Dr. Thiago Barbosa Cahú

RECIFE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Milena Marcia da

Produção, caracterização e avaliação das atividades antioxidante e antitumoral de oligossacarídeos de quitosana obtidos a partir dos resíduos do processamento do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* – Recife: O Autor, 2015.

89 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador: Thiago Barbosa Cahú

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências

- 1. Oligossacarídeos 2. Quitosana 3. Camarão I. Bezerra, Ranilson de Souza (orientador) II. Cahú, Thiago Barbosa (coorientador) III. Título**

572.565

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-087

MILENA MARCIA DA SILVA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTITUMORAL DE OLIGOSSACARÍDEOS DE
QUITOSANA OBTIDOS A PARTIR DOS RESÍDUOS DO
PROCESSAMENTO DO CAMARÃO MARINHO *Litopenaeus vannamei*

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

Aprovado por:

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco
Presidente - Orientador

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Universidade Federal de Pernambuco
Membro Titular Interno

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Membro Titular Externo

Profa. Dra. Marina Marcuschi
Universidade Federal de Pernambuco
Membro Titular Interno

Data: 31 / 07 / 2015

À minha amada mãe Marcia Maria, pelo amor incondicional, incentivo, ensinamentos, apoio
e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todo amor e inspiração, e a Nossa Senhora pelo doce acolhimento e intercessão.

À toda a minha família pelo amor, apoio, e incentivo. Em especial à minha mãe, Marcia, meu pai Maurício, meu irmão Renan, por todo sacrifício, ensinamento. Tudo o que sou é graças a vocês e por vocês.

Ao meu querido e amado Cezar Antonio, pelo amor, companheirismo, carinho, incentivo e paciência ao longo da caminhada, bem como à sua família pelo carinho.

Ao Professor Dr. Ranilson Bezerra, meu orientador, pelo acolhimento, no Laboratório de Enzimologia e pelo incentivo em minha jornada.

Ao Dr. Thiago Cahú, meu co-orientador, que me acolheu e me direcionou com toda sua generosidade.

À Professora Dra Vera Menezes, Professora Dra Teresinha Silva, Dra Jaciane Aguiar, Professora Dra. Noemia Pereira, Sandrelli Meridiana, Clovis Macedo pela parceria e em especial ao querido José Guedes pela dedicação e generosidade em me ajudar a finalizar este trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado, bem como à FINEP, CAPES e FACEPE, por financiarem os projetos desenvolvidos no LABENZ.

À Universidade Federal de Pernambuco, Programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia como também ao Departamento de Bioquímica que me concederam suporte acadêmico e estrutural e aos funcionários, especialmente Seu João, Miron, Djalma e seu Fredson pelos serviços prestados com tamanha dedicação.

Aos queridos amigos do LABENZ, Cybelle, Fábio, Douglas, Augusto, Renata, Caio, Juliana, Kelma, Juliett, Werlayne, Ian, Diego, Helane, Robson, Vagne, Amália, Cleópatra, Cláudia, Jéssica, Guilherme, Marly, Daniela Campeche, Danielli Matias, Flávia, Paula, Luiz, Nathalia, Rafael, Kívia, Célio, por compartilharem momentos de alegria, trabalho e ensinamento ao longo desses anos, em especial a Raquel, Marina, Janilson, Karollina e Lidiane pela parceria e apoio.

Aos meus amigos Alex, Wal, Hicla, Aline, Thatyanne, Gabriel e meus amigos de graduação e mestrado pelo incentivo, alegria e todo carinho em minha vida.

Aos professores Vera Menezes, Hugo Alexandre, Romero Brandão, Marina Marcuschi e Thiago Napoleão por aceitarem o convite para participarem da banca examinadora desta dissertação.

A todos meu muito obrigada.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.

Jhon Ruskin

RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo pseudonatural, biodegradável, não tóxico, com a natureza catiônica, que possui diversas aplicações biotecnológicas. No entanto, em consequência a sua elevada massa molecular, este polímero apresenta baixa solubilidade em pH neutro e alta viscosidade, limitando assim o seu uso em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos e indústrias agrícolas. A produção de oligossacarídeos de quitosana (QOS) é uma forma eficaz de melhorar a solubilidade de quitosana e diminuir a sua viscosidade, aumentando assim as suas possíveis aplicações. Dessa forma, a proposta deste trabalho foi de produzir QOS obtidos a partir dos resíduos do processamento do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, caracterizar quimicamente e avaliar suas atividades antioxidantes, citotoxicidade, toxicidade aguda e suas atividades analgésicas e antitumorais *in vivo*. A quitosana foi produzida a partir de resíduos de camarão pelo método de autólise enzimática, seguido de hidrólise enzimática durante 20 horas a 40 ° C utilizando pepsina, obtendo a partir desta reação, quitosana de baixo peso molecular e QOS. A caracterização estrutural foi realizada por espectroscopia de infravermelho (FT-IR), de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e de massa (MALDI-TOF). Para determinar a atividade antioxidante, os ensaios de ABTS, quelante de ferro (Fe^{2+}) e a proteção do DNA submetido à reação de Fenton também foram realizadas. A citotoxicidade foi avaliada usando as linhagens tumorais NCI-H292, HT-29, MCF-7, Hep-2 e RAEC. Avaliou-se a toxicidade aguda destes compostos em camundongos, bem como a atividade analgésica e antitumoral dos QOS frente a tumores do tipo carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180. Os QOS produzidos mostraram completa solubilidade e baixa viscosidade em meio aquoso. Os gráficos de FT-IR e RMN mostraram um perfil similar ao da quitosana. Quando analisados por MALDI-TOF, os oligossacarídeos mostraram uma massa molecular entre 0,8-2,6 kDa possuindo um pico majoritário correspondente a estruturas de heptâmero. OS QOS apresentaram, a 1 mg/ml, uma atividade antioxidante por ABTS de 37,94%, e capacidade em quelar íons de ferro de 22,38%, além de exibirem proteção ao DNA a 100 μM . Os QOS obtidos não apresentaram toxicidade celular a 25 μM contra células tumorais. Os compostos apresentaram atividade analgésica dose-dependente e capacidade para a inibição de crescimento tumoral *in vivo*. Para os tumores do carcinoma de Ehrlich, os QOS inibiram 61,8%, enquanto para o sarcoma 180, inibiram 63,1%, do crescimento de tumores em camundongos. Estes resultados mostram a eficácia destes oligômeros, obtidos a partir de resíduos de camarão, em atuar com agentes antioxidantes, atóxicos, além de conferirem ação analgésica e antitumoral *in vivo*. Estudos futuros são importantes para determinar claramente as atividades biológicas destes compostos.

Palavras-chave: Subprodutos da indústria pesqueira; quitoligossacarídeos; antioxidante; citotoxicidade; toxicidade aguda; atividade analgésica; atividade antitumoral.

ABSTRACT

Chitosan is a pseudonatural non-toxic biodegradable polysaccharide, with cationic nature which has several biotechnological applications. However, its high molecular weight results in low solubility at neutral pH and its high viscosity limits its uses in human cosmetic products, food, pharmaceuticals and agriculture industries. The production of chitosan oligosaccharides is an effective way to improve the chitosan solubility and decrease its viscosity, thereby enhancing its application. Accordingly, this work aimed to produce and characterize chitosan oligosaccharides (COS) obtained from the residues of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* process and evaluate their antioxidant, cytotoxic, acute toxicity, analgesic and antitumor activity. Chitosan was produced from shrimp heads by enzymatic autolysis, followed by enzymatic hydrolysis for 20 hours at 40 ° C using pepsin resulting in chitoligosaccharides and low molecular weight chitosan. The characterization was performed by infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR) ¹³C and mass spectrometry (MALDI-TOF). To determine the antioxidant potential of COS experiments using ABTS, reducing power and chelating potential of Fe²⁺ were evaluated, and to understand the protection of DNA biomolecule, the Fenton reaction was performed. The cytotoxicity was evaluated using NCI-H292, HT-29, MCF-7 and Hep-2 human tumor cell lines. We evaluated the acute toxicity of these compounds in mice, as well as the analgesic and antitumor activity *in vivo*. The oligosaccharides produced showed complete solubility and low viscosity in aqueous media. The FT-IR and NMR charts showed a profile close to that of chitosan. When analyzed by MALDI-TOF, oligosaccharides showed a molecular weight between 0.8-2.6 kDa. The antioxidant activity for ABTS was of 37.94%, chelating abilities on ferrous ions was of 22.38 % at 1 mg/mL and exhibited DNA protection for 100 µM. COS obtained did not show cytotoxicity in 25µM. The compounds showed analgesic activity dose dependent and interesting ability to tumor inhibition *in vivo*. For Ehrlich carcinoma tumors COS inhibited 61.8% while for sarcoma 180, COS inhibited 63.1%, of the growth of tumor in mice. These results show the efficiency of these oligomers obtained from shrimp waste heads, which have similar structures to those of chitosan, allowing the improvement of its properties. Future studies are important to determine clearly the biological activities of these compounds.

Keywords: By-products of the fishing industry; chitoligosaccharides; antioxidant activity; cytotoxicity; acute toxicity; analgesic activity; antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Página
Figura 1 Produção de pescado nacional em 2010 e 2011 discriminada por região	18
Figura 2 Produção mundial da pesca e aquicultura	18
Figura 3 Camarão marinho <i>Litopenaeus vannamei</i>	20
Figura 4 Produtos a base de camarão (crustáceos) figurando os principais co-produtos: proteína, quitina/quitosana e pigmentos	21
Figura 5 Estrutura da quitina	22
Figura 6 Estrutura química da quitina e da celulose.	22
Figura 7 Estrutura da quitosana	23
Figura 8 Produção da quitosana a partir da desacetilação alcalina da quitina, onde n é o grau de polimerização	24
Figura 9 Formação de um dissacarídeo através de uma ligação glicosídica. A maltose continua sendo um açúcar redutor, pois a molécula do lado direito manteve seu grupo anomérico.	27

LISTA DE FIGURAS ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1: FT-IR spectrums of Chitosan and products from no-specific enzymatic hydrolysis	76
Figure 2 ^{13}C NMR spectra of COS.	77
Figure 3 MALDI-TOFMS spectrums of Chitosan low weight molecular (A) and Chitoligosaccharides (B).	78
Figure 4 Potential antioxidant of COS (A) ABTS, (B) Chelating effect (C) Protective effects of COS in DNA nicking assay.	79
Figure 5. Analgesic Activity: Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of diluted acetic acid.	80
Figure 6 Inhibition of tumor Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 from the treatment of COS (400 mg/kg) and 5-FU drug	81
Figure 7 Weight of solid tumors Ehrlich carcinoma of the groups treated with saline, COS (400 mg / kg) and 5-FU.	82
Figure 8 Weight of solid tumors Sarcoma 180 of the groups treated with saline, COS (400 mg / kg) and 5-FU.	83
Figure 9 A: The inhibition effect of COS in human tumor cell lines (NCI-H292,HEP-2, MCF-7, HT-29,) concentration of 25 μM ; B: Effect o COS concentrations to RAEC cells.	84

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Página
Tabela 1 Produção mundial de pescado a partir da pesca extrativa e aquicultura	17
Tabela 2 Produção de pescado (t) da aquicultura marinha por espécie	19
Tabela 3 Hidrólise de quitosana catalisada por diferentes enzimas comerciais	29
Tabela 4: Efeito dos oligossacarídeos de quitosana (COS) no crescimento de diferentes tumores em camundongos	32

LISTA DE TABELAS ARTIGO CIENTÍFICO

	Página
Table 1 Table 1. Average molecular weight (Mw) by MALDI-TOF MS and desacetylation degree (DD) values (%) for chitosan (CH), low molecular weight chitosan (LWMCH) and chitooligosaccharides (COS) by FT-IR.	85
Table 2 Prediction of the molecular weight of chitosan oligosaccharides (CTS-OS) by MALDI-TOF MS analysis.	86
Table 3 Antioxidant activity (ABTS+) of COS Mean $\pm$ SD, n = 3. ^a TEAC = antioxidant activity equivalent to Trolox. Each value is expressed as mean $\pm$ SD (n = 3).	87
Table 4 The inhibition effect of COS in human tumor cell lines (NCI-H292, HEP-2, HT-29, MCF-7) compared to doxorubicin at concentration of 25 μ M	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	Quimioterápico 5-fluorouracil
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
CH	Quitosana
COS	Quitoligossacarídeos/oligossacarídeos de quitosana
DD(%) ou GD(%)	Deacetylation degree / Grau de desacetilação
DMEM	Meio de cultura (Meio Eagle Modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FAO	Organização da Nações Unidas para Agricultura e Alimentos
FT-IR	Espectroscopia de Infra Vermelho por Transformada de Fourier
GlcN	Glucosamina (2-desoxi-2-amino glucopiranosídeo)
GlcNAc	N-acetil glucosamina (2-desoxi-2-acetamido glucopiranosídeo)
HEp-2	Carcinoma laringeo humano
HT-29	Cancêr colo humano
LABENZ	Laboratório de Enzimologia
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MCF-7	Carcinoma mamário humano
MTT	(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenilterazzólio
NC1-H292	Carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano
QTS	Quitoligossacarídeos/oligossacarídeos de quitosana
RAEC	Células endoteliais de aorta de coelho
SSA	Aspirina
RMN/NMR	Resonancia Magnética nuclear
TBE	Tris/Borato/EDTA
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethychroman-2-carboxylic acid
TWI	Inibição tumoral

Sumário

1.INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Panorama da indústria pesqueira	17
2.2 Subprodutos gerados da indústria pesqueira	20
2.3 Quitina	22
2.4 Quitosana.....	23
2.4.1 Propriedades da quitosana	24
2.5 Oligossacarídeos de quitosana	26
2.5.1. Hidrólise da quitosana.....	27
2.5.1.1 Hidrólise ácida da quitosana.....	28
2.5.1.2 Hidrólise enzimática da quitosana	28
2.5.2 Aplicações dos oligossacarídeos de quitosana.....	29
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
ARTIGO CIENTÍFICO	45
ABSTRACT.....	47
1.Introduction	49
2. <i>Materials and methods</i>	51
2.1. <i>Materials</i>	51
2.2. <i>Chitosan from waste processing of marine shrimp</i>	51
2.3. <i>Production of Chitoligosaccharides</i>	51
2.4 <i>Characterization</i>	52
2.5 <i>Antioxidant activities</i>	52
2.6 <i>Antitumor activity in vitro/Cytotoxicity assay</i>	54
2.7 <i>Assessment of acute toxicity</i>	55
2.8 <i>Analgesic Activity: Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of diluted acetic acid</i>	55
2.9 <i>Antitumor activity in vivo</i>	55
3. <i>Results and Discussion</i>	56
3.1 <i>Prodution of Chitoligosaccharides</i>	56
3.2 <i>Characterization of Chitoligosaccharides</i>	57

3.3 <i>In vitro</i> antioxidant activity.....	59
3.4 Antitumor activity in vitro/Cytotoxicity assay	62
3.5 Assessment of acute toxicity.....	64
3.6 Analgesic Activity.....	64
3.7 Antitumor activity in vivo.....	65
4. Conclusions	67
Acknowledgments	67
References	68
Figures:.....	76
Tables	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

1.INTRODUÇÃO

O pescado e os produtos pesqueiros estão entre os alimentos mais comercializados no mundo. Estes são oriundos tanto da pesca extrativa, quanto da aquicultura. Embora a captura de organismos aquáticos apresente maior percentual do total de pescado fornecido, é a aquicultura que é responsável por um crescimento significativo, contribuindo dessa forma para o incremento na oferta global de produtos da pesca (FAO, 2012).

No entanto, com a expansão do mercado de pescados em todo mundo, a indústria pesqueira tem gerado consequentemente grande quantidade de resíduos e subprodutos. Estima-se que cerca de 50% do pescado produzido é descartado na forma de resíduo (ARRUDA, 2004). Estes subprodutos, embora sejam biodegradáveis, seu acúmulo excessivo no ambiente causa problemas ambientais e sociais, se transformado em perigo para a saúde pública (CIRA. et al., 2002; MARTONE et al., 2005; ROCHA, et al., 2004).

Os subprodutos gerados pela carcinicultura, que são formados principalmente por cabeças, exoesqueleto e cauda. Tais produtos têm sido alvo de pesquisas que demonstram que esse material é uma importante fonte de biomoléculas, tais como: proteínas, quitina, minerais, glicosaminoglicanos sulfatados e carotenoides. Esses materiais representam uma importante fonte de diversas moléculas bioativas, com amplo potencial de aplicabilidade biotecnológica (CAHÚ et al., 2012).

Dentre estas biomoléculas, a quitina tem recebido considerável atenção. Sua principal destinação encontra-se na produção de quitosana, um composto obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina (DALLAN, 2005). A quitosana, devido a sua composição química, apresenta propriedades funcionais como baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade antimicrobiana e antioxidante, podendo ser usada na área farmacêutica, médica, cosmética e alimentícia (KIM & RAJAPAKSE, 2005). Porém, pelo fato da quitosana apresentar alta massa molecular e ser insolúvel em pH neutro, suas aplicações biológicas são limitadas, o que restringe o seu uso (KUMAR e THARANATHAN, 2004; LI et al., 2005).

Como alternativa a este problema, diversos estudos surgiram propondo metodologias de obtenção e otimização da síntese de derivados hidrossolúveis de quitosana, garantindo assim um aumento significativo das aplicações deste polímero (RONCAL et al., 2007; KANATT et al., 2008; ZHANG et al., 2010). Uma das alternativas para a utilização eficiente da quitosana é através da sua despolimerização, obtendo assim produtos com baixa massa molecular. Esse procedimento origina moléculas que são então classificadas como oligossacarídeos de quitosana (STOYACHENKO & VARLAMOV, 1994).

Os oligossacarídeos de quitosana, por apresentarem tamanho molecular menor que a quitosana, são passíveis de solubilização em água, tornando possível a obtenção de soluções desses oligossacarídeos com baixa viscosidade e em pH neutro. Diversas pesquisas relacionadas com a avaliação das atividades biológicas dos oligossacarídeos de quitosana

vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos, estando evidenciada atividade hipocolesterolêmica efeitos antitumorais e imunológicos, e aplicações como em carreadores de drogas, aceleradores na absorção de ferro e cálcio, entre outras (KIM & RAJAPAKSE, 2005).

O presente trabalho teve como objetivo estudar os oligossacarídeos de quitosana produzidos a partir de resíduos da indústria pesqueira e avaliar suas propriedades através de sua caracterização e estudo de suas atividades biológicas. Para isso, após sua produção através de hidrólise enzimática inespecífica, os oligômeros foram submetidos a análise estrutural por RMN, FT-IR e MALDI-TOF. Para a avaliação de suas atividades, foi analisado seu potencial antioxidante frente aos testes de ABTS, quelante de ferro e teste de proteção ao DNA. Foi avaliada a toxicidade celular, e aguda desses compostos como também sua ação analgésica. Posteriormente, os oligossacarídeos foram avaliados frente a modelos tumorais *in vitro* e *in vivo*.

Os resultados sugerem que os produtos obtidos, além de apresentarem importância econômica e ambiental, também apresentam importância biotecnológica, pois os oligossacarídeos de quitosana apresentam interessantes propriedades que os tornam potenciais alvos para novos estudos com sua provável aplicação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Panorama da indústria pesqueira

O pescado e os derivados pesqueiros encontram-se entre os produtos alimentícios mais comercializados no mundo representando 1% do comércio mundial de mercadorias em termos de valor (FAO, 2012b). Estes produtos são oriundos tanto da pesca extrativa, que envolve a captura de organismos aquáticos, quanto da aquicultura que envolve o cultivo desses animais (FAO, 2012a).

No ano de 2012, a produção mundial de pescado atingiu 158 milhões de toneladas, das quais 91,3 milhões, cerca de 58%, foram oriundos da pesca e 66,6 milhões, cerca de 42% da aquicultura (Tabela 1). A produção oriunda da aquicultura em 2014 mostra claramente a destacada hegemonia do Continente Asiático, cuja participação correspondeu a 91,3% da produção mundial desse setor.

Tabela 1: Produção mundial de pescado a partir da pesca extrativa e aquicultura.

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<i>(Million tonnes)</i>						
PRODUCTION						
Capture						
Inland	10.1	10.3	10.5	11.3	11.1	11.6
Marine	80.7	79.9	79.6	77.8	82.6	79.7
Total capture	90.8	90.1	90.1	89.1	93.7	91.3
Aquaculture						
Inland	29.9	32.4	34.3	36.8	38.7	41.9
Marine	20.0	20.5	21.4	22.3	23.3	24.7
Total aquaculture	49.9	52.9	55.7	59.0	62.0	66.6
TOTAL WORLD FISHERIES	140.7	143.1	145.8	148.1	155.7	158.0

Fonte FAO, 2014

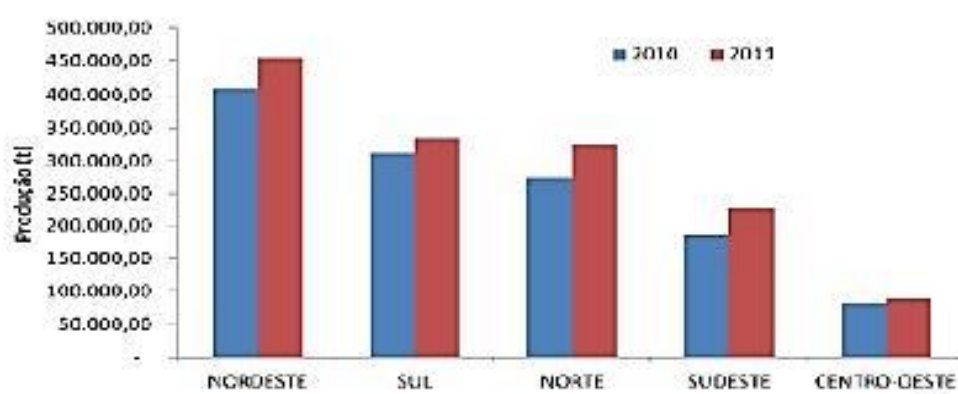
No cenário mundial, a China é o país que se consolida como líder absoluto tanto na pesca extrativa como na aquicultura, com uma produção, em 2012, de 16,19 e 41,1 toneladas respectivamente (FAO, 2014). O Brasil, por sua vez ocupa, segundo dados do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA, 2013), o 19º lugar na produção de pescado mundial com 1,26 milhões de toneladas provinda da pesca extrativa e aquicultura, o que corresponde a 0,75% do total gerado pelos 30 maiores produtores em 2010.

Quando analisado apenas os países da América do Sul, o Brasil aparece em 3º lugar. O Peru que registrou uma produção em torno de 4,4 milhões de toneladas, e Chile, com aproximadamente 3,8 milhões de toneladas ocupam o 1º e o segundo lugar, respectivamente. (FAO, 2012b; MPA, 2013).

No Brasil, a produção de pescado para o ano de 2011 foi de 1,4 toneladas, alcançando um aumento de aproximadamente 13,2% em relação a 2010. A pesca extrativa marinha continuou sendo a principal fonte de produção de pescado nacional, sendo responsável por 38,7% do total de pescado, seguida pela aquicultura continental com 38,0%, pesca extrativa continental 17,4% e aquicultura marinha que alcançou aproximadamente 6% (MPA, 2013).

Em 2011, a região Nordeste continuou registrando a maior produção de pescado do país, com 454.216,9 toneladas, respondendo por 31,7% da produção nacional. As regiões Sul, Norte, Sudeste e Centro-Oeste registraram 23,5%, 22,8%, 15,8% e 6,2%, respectivamente (Figura 1).

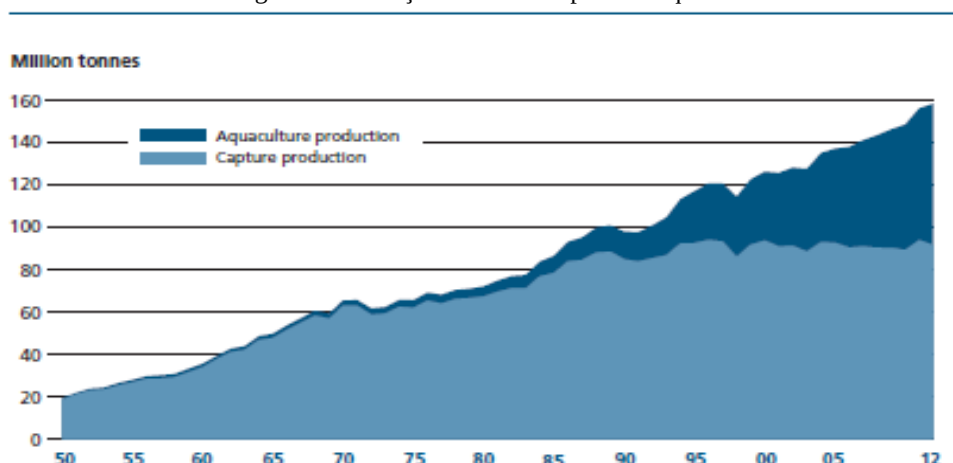
Figura 1. Produção de pescado nacional em 2010 e 2011 discriminada por região



Fonte: MPA, 2013

Embora a captura de organismos aquáticos, apresente maior percentual do total de pescado fornecido, a produção mundial de pescado vem apresentando estabilidade de produção desde a década de 80, em que no período de 2002 a 2010, houve uma diminuição de 93 para 89,1 milhões de toneladas (Figura 2). Por outro lado, a aquicultura nas últimas décadas vem apresentando um crescimento significativo, alcançando uma taxa média de crescimento anual de 8,8% (FAO, 2012a). O rápido crescimento da aquicultura nos últimos anos demonstra o bom desempenho desta atividade no cumprimento de seu papel em satisfazer a crescente demanda de consumidores por pescados, através de um incremento na oferta global de produtos da pesca (FAO, 2012a).

Figura 2. Produção mundial da pesca e aquicultura



Fonte: FAO, 2014

A aquicultura é um dos sistemas de produção de alimentos com maior taxa de crescimento no mundo, o que coloca esta atividade em foco pela grande oportunidade de produção de alimentos, geração de postos de trabalho e desenvolvimento de negócios (HOWARTH, 1996). Esse sistema de produção abrange as seguintes especialidades: piscicultura, malococultura, ostreicultura, miltucultura, algicultura, ranicultura, criação de jacarés e carcinicultura (MPA, 2010).

A carcinicultura, por sua vez, é a modalidade da aquicultura que envolve a criação de camarão em viveiros, ou ainda de caranguejo e siri. Em 2012 a produção mundial de camarão registrou uma nova máxima de 3,4 milhões de toneladas (FAO, 2014). Esta atividade representa, aproximadamente, 4,5 % da aquicultura mundial, movimentando mais de 16 bilhões de dólares. O camarão cultivado representa, cerca de 15% do valor total dos produtos de pescado comercializados internacionalmente. Os maiores exportadores são Tailândia, China e Vietnã. Os Estados Unidos da América continuam a ser o principal importador, seguido pelo Japão (FAO, 2012b).

A carcinicultura é, majoritariamente, a atividade mais expressiva da maricultura brasileira alcançando 77,98% do pescado produzido nessa atividade (Tabela 2). Os estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Bahia e Pernambuco se apresentam como os maiores produtores de camarão cultivados no Brasil (MPA, 2013).

Tabela 2. Produção nacional de pescado (t) da aquicultura marinha por espécie

Espécie e Tipo de Cultura	2011
TOTAL	84.212,3
MALACOCULTURA	18.541,7
Mexilhão	15.989,9
Ostra	2.538,4
Vieira	13,4
CARCINICULTURA	65.670,6
Camarão	65.670,6

Fonte: MPA, 2013

Dentre as espécies de camarão mais importantes comercialmente no mundo (*Litopenaeus vannamei*, *Penaeus monodon* e *Penaeus chinensis*) a espécie *L. vannamei* é mais comumente cultivada no Brasil (FAO, 2012b; CAHÚ et al., 2012).

O *L. vannamei*, também conhecido como camarão branco do pacífico (Figura 3), é considerada a espécie mais importante para a carcinicultura no Hemisfério Ocidental. Esta espécie é oriunda da Costa Sul Americana do Oceano Pacífico, predominante na faixa costeira do Equador. É uma espécie que vem sendo cultivada em todos os países produtores de camarão do mundo ocidental. Considerada de porte médio, apresenta um elevado desempenho reprodutivo em laboratório, com ótimo desempenho zootécnico, possuindo

taxas de crescimento uniformes e fácil adaptabilidade a diferentes condições ambientais (FAO, 2012b; FREITAS et al., 2009).

Figura 3. Camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: <https://www.google.com.br/search?q=litopenaeus+vannamei&biw;> acesso em 16/06/2015.

2.2 Subprodutos gerados da indústria pesqueira

Com a expansão do mercado de pescados em todo mundo e, conseqüentemente, do volume de pescado processado, a indústria pesqueira tem gerado grande quantidade de resíduo e subprodutos. Estima-se que cerca de 50% do pescado produzido é descartado na forma de resíduo (ARRUDA, 2004). Considerando que em 2012 foram produzidas 158 milhões de toneladas de pescado no mundo (FAO, 2014), isso equivaleria a 79 milhões de toneladas de resíduos. Estes subprodutos, embora sejam biodegradáveis, seu acúmulo excessivo no ambiente, associado à sua natureza altamente perecível, gera um grande problema de ordem social. Conseqüentemente se transforma em perigo para a saúde pública, por tornar-se rapidamente colonizado por organismos de deterioração e atraírem insetos e roedores. Outro agravante é que estes resíduos são, em geral, clandestinamente enterrados ou jogados nos rios e mares, causando problemas ambientais (CIRA et al., 2002; MARTONE et al., 2005; ROCHA, et al., 2004).

Com o intuito de agregar valor ao resíduo de processamento do pescado, estudos vêm sendo realizados visando o reaproveitamento desses biomateriais, tornando assim a atividade aquícola mais sustentável e viável ecologicamente (BEZERRA, et al. 2001). No caso dos subprodutos gerados pela carcinicultura (que são formados principalmente por cabeças, exoesqueleto e cauda), pesquisas têm demonstrado que esse material é uma importante fonte de biomoléculas (Figura 4) tais como, proteínas, quitina, minerais, glicosaminoglicanos sulfatados, carotenoides e compostos aromáticos. Desta forma, constitui um material riquíssimo por possuir uma variedade de moléculas bioativas, com amplo potencial de aplicabilidade biotecnológica (COWARD-KELLY et al., 2006; ARVANITOYANNIS et al., 2008; CAHÚ et al., 2012; BOUGATEF, 2013).

As proteínas e os carotenoides podem ser extraídos para uso na indústria farmacêutica e alimentícia (HE et al., 2013; MAZZOMO et al., 2011; SANTOS et al., 2012). O carbonato de cálcio pode ser utilizado como matéria-prima em construção de edifícios e na produção

de cal (óxido de cálcio) (YANG et al., 2005). Os glicosaminoglicanos sulfatados podem ser amplamente utilizados em aplicações biomédicas (CHEN et al., 2011) e a quitina tem uma variedade de utilizações nas mais diferentes áreas, principalmente quando é convertida em quitosana (SALAH et al 2013; SANSONE et al., 2014; ISLAM et al., 2014).

Figura 4: Produtos a base de resíduos do processamento de camarão (e/ou outros crustáceos) figurando os principais coprodutos: proteína, quitina/quitosana e pigmentos:

1-matérias primas; 2- produtos recuperados; 3-derivados de quitina; 4-produtos a base que quitosana; 5-produtos a base de astaxantina (microalga); 6-produtos a base de farinha de camarão.

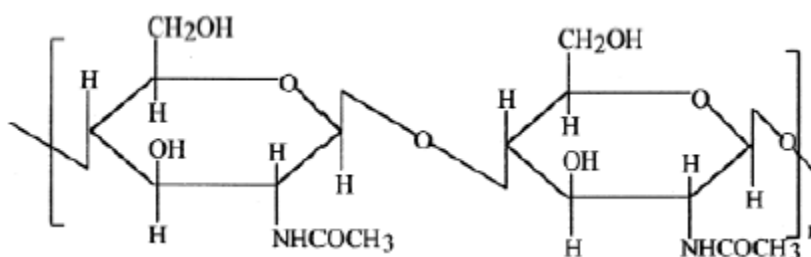


2.3 Quitina

A Quitina foi descrita pela primeira vez em 1811 pelo francês Henri Branconnot, professor de história natural, que durante suas pesquisas com *Agaricus volvacus* e outros fungos, com solução alcalina, obteve uma substância identificada em plantas, a qual denominou de “fungine” ou “fungina” (ANJOS, 2005; SKAUGRUD; SARGENTE, 1990). Em 1823, Odier isolou uma substância contida nas carapaças de insetos semelhante à encontrada em plantas, a chamou de quitina, que em grego “Khitón” significa túnica, envelope ou cobertura. Ledderhose em 1878 identificou a quitina como sendo um composto de glucosamina e Gilson (1894) confirmou a presença de glucosamina na quitina (STAMFORD, 2007).

A quitina é um polissacarídeo natural, insolúvel em água, linear composto por unidades β - (1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosamina (Figura 5)(CANELA E GARCIA, 2001).

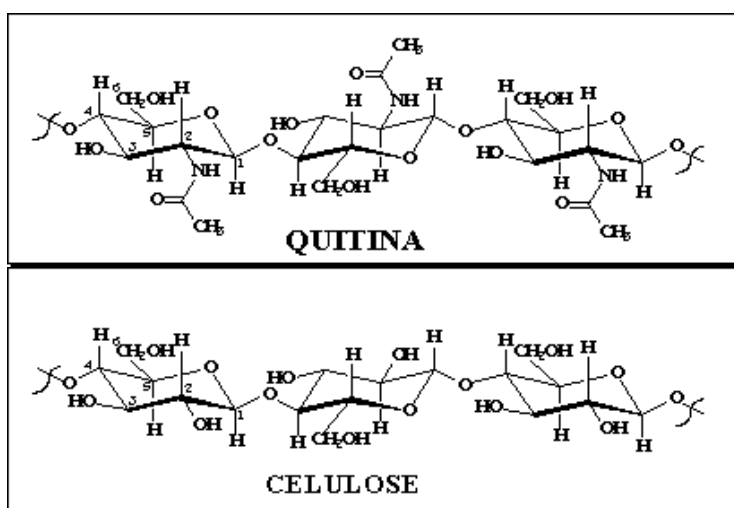
Figura 5. Estrutura da quitina



Adaptada de KUMAR (2000).

Esse biopolímero é sintetizado por diversos organismos vivos, e é o polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose (KUMAR, 2000; KURITA 2001). A estrutura da quitina é similar à da celulose, exceto pelo fato de que o grupo hidroxila (-OH) do carbono na posição 2 do anel glicopiranosídico é substituído pelo grupo acetamida (Figura 6). Esta semelhança estrutural é refletida nas funções análogas desses dois polissacarídeos na natureza, pois ambos atuam como material estrutural e protetor (SIGNINI, 2002; CAMPOS-TAKAKI, 2005).

Figura 6. Estrutura química da quitina e da celulose.



Fonte: Signini, 2002.

A quitina é encontrada na natureza sob forma de microfibrilas cristalinas, formando o componente estrutural dos exoesqueletos de artrópodes e das paredes celulares de fungos e leveduras. Além de ser produzida por estes organismos, também pode ser sintetizada por uma série de outros organismos dos reinos animal e vegetal, surgindo quando reforço e resistência são necessários (RINAUDO, 2006).

Embora encontrada em animais e fungos, as principais fontes comerciais de quitina são as carapaças de camarão e de caranguejos, que são descartadas pelas indústrias pesqueiras (ZOHURIAAN-MEHR, 2005). Caso não seja aproveitada, a quitina pode se tornar um grande problema de poluição (KUMAR, 2000).

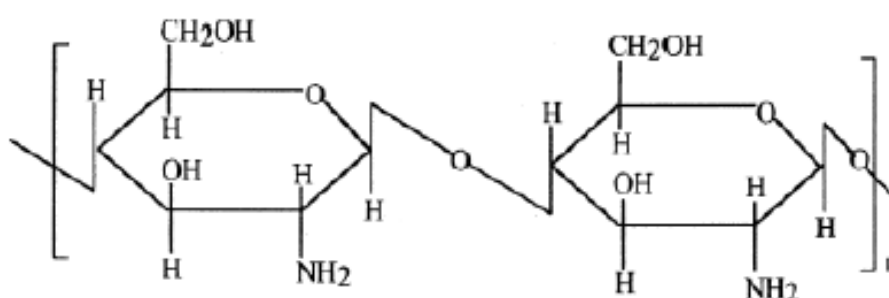
As cascas secas dos crustáceos possuem cerca de 20 a 30% de quitina, esta que está firmemente associada aos demais constituintes do exoesqueleto como proteínas (30- 40%), carbonato e fosfato de cálcio (30-50%), além de pigmentos como os carotenoides astaxantina, cantaxantina, luteína e β -caroteno (CANPANA-FILHO et al , 2007; CAHU et al., 2012; ARANCIBIA et al., 2014; CANELLA e GARCIA, 2001). Em consequência da associação da quitina com os demais componentes do exoesqueleto das cascas dos crustáceos é necessário um tratamento ácido para dissolver o carbonato, seguido de uma extração alcalina para solubilizar as proteínas e despigmentação para remoção dos pigmentos residuais. A quitina resultante deve ser classificada em termos de pureza e cor, dado que resíduos de proteínas podem inviabilizar seu uso especialmente para aplicações biomédicas (RINAUDO, 2006).

O uso da quitina é restrito, pois é insolúvel na maioria dos solventes usuais. Sua principal aplicação encontra-se na produção de quitosana, um composto produzido a partir da sua desacetilação alcalina, com propriedades que permitem que a quitosana seja utilizada em diversas áreas (DALLAN, 2005)

2.4 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo que foi descoberto em 1859 por Rouget, quando a quitina entrou em contato com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição (DALLAN, 2005). Ela é um polissacarídeo linear composto por unidades repetidas de 2-amino-2-deoxi-D-glucosamina (GlcN) (Figura 7) que estão unidos por ligação glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4) (KURUTA, 2001; PETER, 2005).

Figura 7- Estrutura da quitosana.

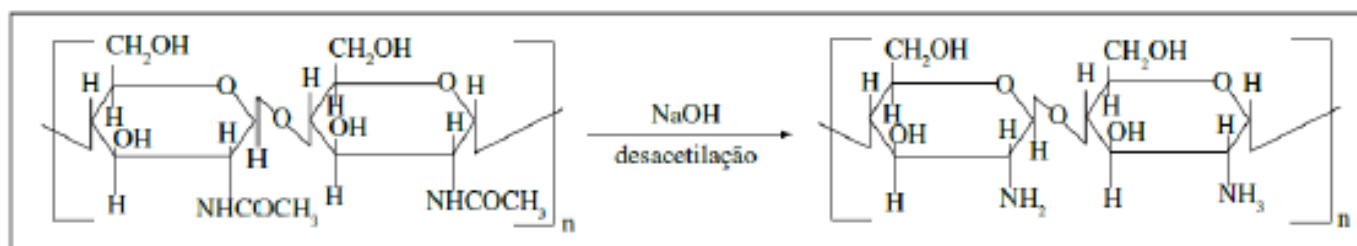


Adaptada de KUMAR (2000).

A quitosana é uma molécula obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina. Durante este processo de desacetilação, as ligações N-acetil são hidrolisadas, formando-se a D-glicosamina, que contém um grupo amino livre (DALLAN, 2005). Este processo também pode ocorrer utilizando enzimas específicas, como a quitina desacetilase ou pela ação de microrganismos que sintetizem tal tipo de enzima (MONTEIRO JÚNIOR 1999; KIM E RAJAPAKSE, 2005).

A figura 8 ilustra a reação de desacetilação alcalina em que a quitina é submetida para obtenção da quitosana. Nesse processo os grupamentos acetoamido ($-\text{NHCOCH}_3$) são transformados em grupos amino ($-\text{NH}_2$), dando origem a quitosana. A extensão de desacetilação da quitina é classificada como grau de desacetilação. Quando a quantidade de D-glicosamina, ou seja, o grau de desacetilação se torna maior que 50%, a quitina passa a ser solúvel no meio aquoso e o polímero é denominado quitosana (DALLAN, 2005). A completa desacetilação da quitina é dificilmente realizada, pois à medida que este grau aumenta, a possibilidade de degradação do polímero também aumenta (ABRAM, 2004).

Figura 8. Produção da quitosana a partir da desacetilação alcalina da quitina, onde n é o grau de polimerização.



Fonte: SPIN-NETO e colaboradores (2008).

A presença dos grupamentos de amino livres (NH_2) no carbono 2 de cada resíduo monomérico da quitosana, confere a este biopolímero o comportamento polieletrólito catiônico ($\text{pK}_a = 6,3$). Em consequência disto, a quitosana é insolúvel em água, soluções básicas e solventes orgânicos, porém é solúvel na maioria das soluções orgânicas ácidas quando o pH desta solução seja menor que 6,3. Em meio aquoso ácido, esta tem seus grupos amínicos protonados (NH_3^+) apresentado uma elevada densidade de carga positiva. (RODRÍGUEZ-PEDROSO et al., 2009).

2.4.1 Propriedades da quitosana

A quitosana é um dos poucos polissacarídeos pseudonatural com caráter catiônico, e esta característica é responsável pela maioria de suas propriedades. Essa particularidade possibilita a sua interação com cargas negativas, geralmente presentes na superfície de biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, justificando seus efeitos sobre elas (SANTOS et al., 2003). Este fato contribui com a

atividade antimicrobiana contra diversas bactérias e fungos, pois os grupamentos amino positivos das unidades glicosamina possivelmente interagem com os componentes negativos das paredes celulares das bactérias, suprimindo a biossíntese (SHI et al., 2006). Além disso, a quitosana interrompe o transporte de nutrientes através da parede celular e causa o vazamento de organelas celulares, acelerando a morte da bactéria. Outro mecanismo proposto envolve a penetração de quitosana de baixa massa molar na célula a qual se liga ao DNA inibindo a síntese de RNA e proteínas (VINSOVA e VAVARIKOVA, 2008).

Estudos sugerem que os efeitos da quitosana sobre as bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas sejam distintos. No caso das *gram*-positivas, a hipótese é que a quitosana de alta massa molar forme películas ao redor da célula e gera a inibição da absorção de nutrientes. Por outro lado, a quitosana de baixa massa molar penetra mais facilmente em bactérias *gram*-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses organismos (COSTA SILVA et al., 2006).

Alguns investigadores têm reportado que quitina e quitosana induzem a analgesia. (SILVA, et al., Allan et al., 1984). Allan et al.(1984) verificaram que a quitosana forneceu uma sensação refrescante, agradável e calmante tópico quando aplicada em feridas abertas Okamoto et al.(1995) e Shigemasa & Minami (1996) observaram em animais que, quitina e quitosana aceleram a cicatrização de feridas, reduzem a frequência de tratamento, diminuem a dor e protegem a superfície da ferida. Os animais não sentiram dor quando suas feridas foram cobertas com quitina e quitosana.

Tanto a quitina, como a quitosana reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana mais eficaz. Este fato se deve à capacidade da quitosana em agregar tanto as plaquetas, como hemácias pela interação entre as cargas positivas dos grupos amínicos livres com as cargas negativas dos receptores. A ação da quitosana sobre as plaquetas produz mais um efeito benéfico, que é a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas AB e fator de transformação do crescimento β_1 , que desempenham papel importante a cicatrização (COSTA SILVA et al., 2006).

A quitosana também possui propriedade imunomoduladora, que é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos. Isto explica não só o papel da quitosana na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a degradação desse polímero no organismo. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitosana liberam interleucina 1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam também, N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese de ácido hialurônico e outros glicosaminoglicanos da matriz extracelular dos fibroblastos. Eles promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória. As atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que este polímero pode prevenir infecções, quando aplicado diretamente no local da lesão (SUZUKI et al., 1986; TOKORO et al., 1988; XIA, 2003).

Outra importante propriedade da quitosana é de agir como quelante, o que confere a quitosana a capacidade de se ligar seletivamente a moléculas de colesterol, gorduras,

proteínas, células tumorais e íons metálicos. Fatores que afetam a capacidade quelante deste biopolímero são bastante complexos, sendo sugerido que o mecanismo envolve a ligação com o grupo hidroxila do carbono 6 e, principalmente, com o grupo amino situado no carbono 2 (GOY et al., 2004; YEN et al., 2008). Esse grupamento foi apontado como responsável pela capacidade antioxidante da quitosana contra diferentes espécies de radicais instáveis (ARANAZ et al., 2009; ARANCIBIA et al., 2014).

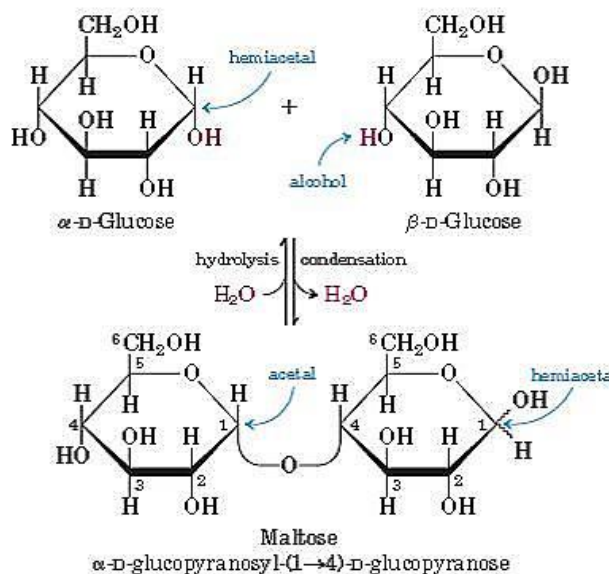
A quitosana tem sido amplamente estudada e é alvo de grande interesse das indústrias médica, farmacêutica, cosmética e alimentícia, pois possui propriedades interessantes como atividade biológica, excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade. Desta forma, são muitas as possíveis aplicações desse polissacarídeo, devido a sua versatilidade (SILVA et al., 2006; PRASHANTH & THARANATHAN, 2007). Porém existem relatos que demonstram que a quitosana apresenta, *in vivo*, atividade comprometida devido à sua baixa absorção pelos organismos. A maioria dos intestinos de animais, principalmente o trato gastrointestinal humano, não produz enzimas capazes de hidrolisar a quitosana. Além disso, a alta massa molecular e viscosidade da quitosana restringem o uso particularmente na medicina e na indústria de alimentos (KUMAR e THARANATHAN, 2004; LI et al., 2005).

Evidências têm mostrado que quitosanas de baixa massa molecular possuem significantes atividades biológicas (KUMAR e THARANATHAN, 2004; LI et al., 2005). Para uma utilização eficiente da quitosana *in vivo*, faz-se necessário a despolimerização para a obtenção de produtos com baixo peso molecular, esse procedimento origina oligossacarídeos de baixa massa molar, sendo então classificados como quitooligossacarídeos (QOS) (STOYACHENKO e VARLAMOV, 1994).

2.5 Oligossacarídeos de quitosana

Os oligossacarídeos são polímeros que possuem de 2 a 10 unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Na polimerização de n moléculas de monossacarídeos, ocorre a liberação de $n-1$ moléculas de água, obtidas a partir da condensação do grupo hidroxila anomérico de um monossacarídeo com as hidroxilas da unidade adjacente (FIGURA 9). É essa hidroxila anomérica que confere propriedades redutoras ao monossacarídeo e reduz, principalmente, íons metálicos como cobre e prata e se oxida a ácido carboxílico. Esses carboidratos são denominados redutores devido essa propriedade (RIBEIRO E SERAVALLI, 2007).

Figura 9. Formação de um dissacarídeo através de uma ligação glicosídica. A maltose continua sendo um açúcar redutor, pois a molécula do lado direito manteve seu grupo anomérico.



Fonte: Nelson & Cox (2010).

Os oligossacarídeos pertencem a um importante grupo de carboidratos poliméricos que podem ser encontrados em todos os organismos vivos, seja na forma a livre ou combinado a outros compostos como a glicoproteínas. Vários tipos de oligossacarídeos podem ser encontrados em diversos alimentos, incluindo frutas, vegetais, leite e mel. Quando estão presentes em alimentos, melhoram a qualidade do produto, promovendo efeitos benéficos no organismo, sendo por isso, classificado como alimento nutracêutico (NAKAKUKI, 2002).

Os oligossacarídeos de quitosana, portanto, resultam da despolimerização deste polissacarídeo. Por terem tamanho molecular menor que a quitosana, não apresentam dificuldades quanto à solubilização em água, tornando possível a obtenção de soluções desses oligossacarídeos com baixa viscosidade e em pH neutro. Além dessas propriedades, os oligossacarídeos de quitosana apresentam também atividade antitumoral (SUZUKI et al., 1986; MAEDA & KIMURA 2004; PRASHANTH & THARANATHAN, 2005), atividade antimicrobiana (JEON, PARK, KIM, 2001; ZHENG & ZHU, 2003) e atividade prebiótica (LEE et al., 2002). Tais propriedades têm atraído o interesse de muitos pesquisadores em utilizar os oligossacarídeos derivados da quitosana, principalmente nas áreas médicas e nutricional, em que se observa a possibilidade destes em melhorar a qualidade dos alimentos e saúde humana (NAKAKUKI, 2002; KIM & RAJAPAKSE, 2005).

2.5.1. Hidrólise da quitosana

O processo de hidrólise da quitosana é semelhante ao que ocorre com outros polissacarídeos, onde a presença de determinados agentes rompem as ligações glicosídicas. A degradação dessas ligações pode ser obtida por diferentes metodologias, nas quais os produtos gerados, nesse caso, oligossacarídeos de quitosana, variam o grau de polimerização tanto quanto ao número e sequência das unidades de GlcN (2-amino-2-deoxi-D-glicose) e GlcNAc (2-aceto-amino-2-deoxi-D-glicose) no oligômero gerado. Dentre os métodos já descritos encontram-se o da hidrólise ácida, hidrólise enzimática (utilizando de enzimas específicas ou não específicas), degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio, degradação ultrassônica, químico-enzimático (KIM & RAJAPAKSE, 2005) e radiação (HAI

et al., 2003). Dentre estes métodos os mais empregados são o da hidrólise ácida e enzimática.

2.5.1.1 Hidrólise ácida da quitosana

Para a produção em grande escala de oligômeros de quitosana, a hidrólise ácida pode ser utilizada para romper as ligações glicosídicas da quitosana, sendo empregada para essa metodologia o HCl (DOMARD & CAARTIER, 1989) e HNO₂ (TOMMERAAS et al., 2001). Essa metodologia é de fácil execução, embora esse mecanismo resulte em um baixo rendimento de oligômeros e grande quantidade de monômeros (D-glucosamina), além de, pela possível presença de contaminação por compostos químicos tóxicos, não poderem ser utilizados como material bioativo (CABRERA & CUTSEM, 2005). Outro inconveniente desse método é a necessidade em utilizar altas temperaturas e grandes concentrações de reagentes, podendo gerar possíveis problemas ambientais (RONCAL et al., 2007).

2.5.1.2 Hidrólise enzimática da quitosana

Ao contrário do que ocorre no processo de hidrólise ácida da quitosana, a hidrólise enzimática é realizada em condições brandas. Neste processo, as enzimas realizam a hidrólise de forma mais específica que o ácido, e permitem o controle da reação ao decorrer do processo e, consequentemente, do grau de polimerização dos oligômeros gerados (KIM & RAJAPAKSE, 2005; MING et al., 2006; RONCAL et al., 2007; KUO, CHEN & CHIANG, 2004).

Como citado anteriormente, a hidrólise enzimática da quitosana pode ocorrer utilizando enzimas específicas ou enzimas não específicas. Como enzima específica para este processo tem-se a quitosanase (B-D-2-deoxi-2-amino 1→4 glucosidade). Esta enzima pode ser encontrada em uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, actinomicetos e fungos e, em pequena quantidade, em plantas (CHEN; XIA; YU, 2005). A produção de oligossacarídeos de quitosana por via enzimática, em que se utilize a quitosanase, é limitada devido a ausência de uma produção constante e eficiente de quitosanases que garantam um processo de baixo custo. Como alternativa, estudos foram realizados utilizando enzimas inespecíficas que diminuíssem o custo de produção e alcançasse êxito na produção desses oligômeros (CABRERA & CUTSEM, 2005; RONCAL et al., 2007).

A hidrólise enzimática realizada por enzimas inespecíficas tem sido descrita na literatura como uma alternativa efetiva na obtenção de oligossacarídeos e de polímeros com menor massa molar. É atrativa pelo menor custo relativo em comparação com enzimas específicas. Em consequência disso, alguns pesquisadores têm estudado enzimas comerciais não específicas (PANTALEONE, YALPANI & SCOLLAR, 1992), pois estas têm sido usadas em indústrias alimentícias por muitos anos e são relativamente seguras e com menor custo.

Roncal e colaboradores (2007) descrevem um trabalho em que se investigou a capacidade de enzimas inespecíficas, como a celulase, pepsina e lipase, em hidrolisar a

quitosana em comparação com quitosanase. Como resultado foi observado que em 1 hora de reação a viscosidade diminuiu em 80% e em 20 horas, 89% quando utilizado a pepsina. A quitosanase em 1 hora reduziu a viscosidade em 65% e em 20 horas a 96%. Também foi observada a formação dos terminais redutores ao longo da hidrólise, onde a lipase A e a quitosanase foram mais eficientes em gerar tais terminais (Tabela 3).

Tabela 3. Hidrólise de quitosana catalisada por diferentes enzimas comerciais ^a.

^a Atividade enzimática foi mensurada a partir da diminuição da viscosidade e pela formação dos terminais redutores.

^b A lipase A foi submetida a ao pH de 3,0, diferente das demais que foi 4,5.

Enzyme	Viscosity decrease (%)		Reducing ends (mM)	
	<i>t</i> = 1 h	<i>t</i> = 20 h	<i>t</i> = 1 h	<i>t</i> = 20 h
Bromelain	61	86	—	0.51
Lysozyme	28	41	—	0.20
Cellulase	69	85	0.34	3.11
Pepsin	80	89	0.43	3.32
Lipase A ^b	82	97	0.26	4.69
Papain	42	70	—	0.28
Protease type XIV	37	82	—	0.42
Chitosanase	65	96	0.41	5.46

Roncal e colaboradores (2007)

Pôde-se observar, através de estudos cinéticos, que as enzimas testadas possuem ação de endo-enzimas, pois a hidrólise da solução de quitosana provocou intensa redução da viscosidade do meio devido à degradação do polímero em produtos de cadeia menor (RONCAL, et al.; 2007). O mecanismo de degradação da quitosana por essas enzimas não está muito claro, entretanto, foi demonstrada a atividade hidrolítica sobre a quitosana para as enzimas papaína (de origem vegetal), lipase, celulase, pectinase, glucanase e protease (de origem microbiana) (MUZZARELLI et al.; 1995; IZUME et al.; 1992; RONCAL et al.; 2007).

2.5.2 Aplicações dos oligossacarídeos de quitosana

Os oligossacarídeos obtidos a partir da hidrólise da quitosana têm despertado muito interesse na área farmacêutica, alimentícia e médica, devido às suas propriedades biológicas. Diversas pesquisas relacionadas com a avaliação dessas atividades biológicas vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos, sendo evidenciada atividade antimicrobiana (ALLAN & HADWIGER, 1979; KENDRA & ADWIGER, 1984; NO, ARK, LEE, & MEYERS, 2002; SEKIGUCHI et al., 1994; SUDARSHAN, HOOVER, & KNORR, 1992; UCHIDA, LZUME, & OHTAKARA, 1989; WEI & XIA, 2003; ZHAO & XIA, 2006), hipocolesterolêmica (KIM & RAJAPAKSE, 2005; MAEZAKI et al., 1996; SUGANO et al., 1980; SUGANO, WATANABE, KISHI, IZUME, & OHTAKARA, 1988; ZHOU, XIA, ZHANG, & YU, 2006), efeitos antitumorais e imunológicos (SUZUKI et al., 1986;

TOKORO et al., 1988; XIA, 2003), carreadores de drogas, (BRAVO- OSUNA, MILLOTTI, VAUTHIER, & PONCHEL, 2007; LIAO et al., 2007; PARK, SARAVANAKUMAR, KIM, & KWON, 2010; SINSWAT & TENGAMNUAY, 2003; THANOU, VERHOEF, & JUNGINGER, 2001), aceleradores na absorção de ferro e cálcio (BRAVO-OSUNA et al., 2007; DEUCHI, KANAUCHI, SHIZUKUISH, & KOBAYASHI, 1995; JEON, SHAHIDI, & KIM, 2000; JUNG, MOON, & KIM, 2006; LIAO et al., 2007; SINSWAT & TENGAMNUAY, 2003; XIA, 2003), além de antioxidante, e outras.

2.5.2.1 Propriedade antioxidante dos oligossacarídeos de quitosana

O estresse oxidativo tem sido identificado como um ponto comum para várias doenças crônicas como diabetes, artrite, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e tumores. Essas doenças estão diretamente relacionadas com a oxidação de biomoléculas por espécies reativas de oxigênio geradas extensivamente pelos tecidos (CALABRESE et al., 2005). Em algumas doenças, tratamentos envolvendo antioxidantes têm mostrado ser efetivo em reduzir marcadores do estresse oxidativo levando ao crescente interesse na progressão do desenvolvimento mundial para explorar efetivos antioxidantes de moléculas sequestradoras de radicais livres, especialmente as de origem natural (MENDIS et al., 2007). Os sequestradores de radicais livres são antioxidantes preventivos e a presença destes compostos pode inibir eventos e as sequências oxidativas em diferentes níveis (KIM & RAJAPAKSE, 2005).

As propriedades antioxidantes dos oligossacarídeos têm atraído atenção, principalmente devido a sua habilidade de doar prótons, pois o radical livre pode reagir com o grupo NH_2 formando o grupo NH_3^+ em consequência da absorção do íon hidrogênio da solução. Além destes grupos, as hidroxilas dos carbonos 2, 3 e 6 do anel piranosídico pode reagir com radicais livres instáveis para formar moléculas estabilizadas (KIM & RAJAPAKSE, 2005). Essa propriedade antioxidante depende do grau de desacetilação e da massa molecular desses oligossacarídeos pois essa atividade está diretamente relacionada com a protonação dos grupos amina (RAJAPAKSE et al., 2007; XIE, W., XU, P., LIU, Q., 2011). Baseados em resultados obtidos em estudos utilizando a técnica de aprisionamento de elétron (*Electron Spin Trapping*), os oligossacarídeos de quitosana com um peso molecular entre 1-3 KDa têm sido identificados por seu alto potencial em sequestrar radicais livres (PARK, JE & Kim, 2003a)

A geração de espécies reativas de oxigênio por células endoteliais está envolvida em várias condições clínicas associadas à aterosclerose, hipercolesterêmica e coagulação intravascular disseminada (PANDIAN et al., 2005; FASANARO et al., 2006). A utilização de oligossacarídeos de quitosana em cultura de células endoteliais mostrou a melhora na injúria celular em associação com o estresse oxidativo. Além disso, influencia na apoptose e na progressão do ciclo celular por atenuar o estresse oxidativo exógeno (LIU & ZENG, 2009).

2.5.2.2 Efeitos Antitumorais dos oligossacarídeos de quitosana

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pelo desenvolvimento de massa tecidual resultante de uma divisão celular exacerbada. No desenvolvimento dessas doenças, o crescimento do tecido neoplásico supera o número de células do tecido sadio (KIRCHNER, 2014). Entre as linhas para a terapêutica do câncer, tem-se o uso de fármacos antineoplásicos, que apesar de ser o principal meio de tratamento, apresenta alguns obstáculos devido ao seu baixo índice terapêutico, fazendo com que a dose terapêutica seja similar a dose tóxica, o que provoca muitos efeitos colaterais ao paciente (FUKUMASU et al., 2008). Entre as principais drogas utilizadas na terapêutica, tem-se o 5-fluoruracil. Este quando administrado é metabolizado em monofosfato de fluorodeoxiurina (FdUMP), um metabólito ativo que inibe a ação da enzima timidilado sintase, bloqueando a biossíntese de DNA, promovendo a apoptose (MALET-MARTINO et al., 2002). O 5-fluoruracil apresenta variabilidade na resposta terapêutica e na toxicidade (BARATTE et al., 2010).

O crescimento do número de novos casos de câncer tem impulsionado pesquisas que visam encontrar alternativas de tratamento para esse conjunto de doenças (HURYN, 2013; REITZ, 2013). Estudos com novos compostos com atividade antitumoral, a cultura de células tem sido uma ferramenta fundamental. Este modelo experimental do câncer possibilita uma análise rápida do efeito antineoplásico do composto frente a células cancerígenas, pois o cultivo de células possui capacidade de fácil multiplicação gerando assim grande quantitativo de células uniformes morfológicamente (CARVALHO, 1996).

Além do sistema de cultivo em vitro, outros sistemas de pesquisa de atividade antitumoral têm sido utilizados como a indução de carcinogênese em modelos animais possibilitando a avaliação de diversos processos envolvidos no desenvolvimento do câncer, como angiogênese, metástase e inflamação. Um dos modelos amplamente utilizados tem sido o Carcinoma de Ehrlich. Essa neoplasia foi descrita em 1905 como carcinoma mamário oriundo de camundongos fêmeas (EHRlich & APOLANT, 1905). Só em 1932 que esse tumor adquiriu a forma ascítica, passando a ser inoculado por via peritoneal nos animais teste (LOEWENTHAL, J., 1932). Diversas vantagens desse modelo de tumor permitiram que ele fosse amplamente utilizado na pesquisa por compostos bioativos contra o câncer. Entre essas características estão a sua capacidade de crescimento rápido e elevada agressividade para o organismo (AJITH; JANARDHANAN, 2003).

Outro modelo bastante utilizado é o do tumor Sarcoma-180. É um tumor sólido que pode ser inoculado por via subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, crescendo rapidamente (SHABEL, 1977). O Sarcoma-180 foi um dos primeiros tumores utilizado em animais para pesquisar o câncer, por propiciar um bom manejo e cultivo, uma inoculação subcutânea de simples realização e um crescimento satisfatório nos animais que receberam a inoculação dessas células (QI, L. & XU, Z., 2006). Ao longo dos anos a busca por novos compostos que possuam atividade antineoplásica forte, porém de baixa toxicidade, tornou-se alvo de inúmeras pesquisas.

Atividade biológica dos oligossacarídeos de quitosana em inibir o crescimento de tumores foi descrito na literatura. Essa atividade é dependente da característica estrutural

destes compostos, como o grau de desacetilação e o peso molecular dos oligômeros (KIM & RAJAPAKSE, 2005) (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito dos oligossacarídeos de quitosana (COS) no crescimento de diferentes tumores em camundongos

COS			Tumor type	Inhibition (%) ^a	Ref.
MW (kDa)	DD (%)	Dose (mg/(kg/day))			
~ 1	100	10	Meth-A solid tumor	41	Tokoro et al. (1998)
~ 1	100	300	Sarcoma 180 solid tumor	93	Suzuki et al. (1986)
~ 1	100	500	MM 46 solid tumor	55	Suzuki et al. (1986)
6.5–12	90	10	Sarcoma 180 solid tumor	61.7	Jeon and Kim (2002)
1.5–5.5	90	10	Sarcoma 180 solid tumor	66.7	Jeon and Kim (2002)
1.5–5.5	90	50	Uterine cervix tumor	73.6	Jeon and Kim (2002)
1.4	85	50	Sarcoma 180 solid tumor	50.4	Qin et al. (2002)
3–10	80	200	Sarcoma 180 solid tumor	56.9	Qin et al. (2002)

^a Inibição do crescimento de tumores calculado como porcentagem, a partir da comparação dos pesos dos tumores tratados com COS e o peso dos tumores do grupo controle. Fonte: (KIM & RAJAPAKSE, 2005)

Estudos sugerem que a atividade antitumoral dos oligossacarídeos de quitosana atuaria não apenas matando as células tumorais, mas também partir de seus efeitos imunológicos aumentando a produção de linfócitos, gerando uma resposta antitumoral de linfócitos-T citotóxicos. (TOKORO, TATEWAKI, SUZUKI, MIKAMI, SUZUKI AND SUZUKI, 1998). Os oligossacarídeos também induzem apoptose celular, foi o que Xu et al. (2008) observaram ao tratar células de hepatocarcinoma (SMMC-7721) com oligossacarídeos de quitosana. O possível mecanismo é que os COS regulam a expressão da proteína pró-apoptótica BA e a ativação de caspases (serino proteases), acionando o programa de apoptose da célula. Foi descrito ainda, que os oligossacarídeos de quitosana manifestam um efeito inibitório de crescimento e antimetastático em carcinoma de pulmão de ratos com administração intramuscular (TSUKADA et al., 1990).

Os oligossacarídeos podem ser fracionados e testados as atividades biológicas dessas frações. Em estudos realizados sobre o efeito antitumoral dos COS, foi evidenciado que estes possuem forte atividade inibitória para o tumor ascítico em camundongos BALB e que os quitoligossacarídeos do tipo N-acetilquitohexose e quitohexose apresentaram efeitos inibitórios muito fortes para o Sarcoma-180 e crescimento do tumor sólido MM 156 em ratos, como foi descrito por TOKORO et al. (1988).

Os oligossacarídeos de quitosana possuem potenciais propriedades que os permitem ser aplicados em diversas áreas. Além de suas interessantes qualidades, a obtenção destes a partir de resíduos da indústria pesqueira faz com que sua produção tenha melhor relação custo/benefício, quando comparados a outros polímeros atualmente utilizados no mercado podendo ser cada vez mais promissor seu uso em maior escala.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar oligossacarídeos de quitosana produzidos a partir de resíduos do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* e avaliar sua atividade antioxidante em sistemas de depleção de radicais livres e sua atividade antitumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir, a partir de quitosana obtida do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, oligossacarídeos por hidrólise enzimática não específica;
- Caracterizar quimicamente as amostras por espectroscopia de infravermelho (FT-IR), ressonância magnética nuclear (^{13}C) e espectrometria de massas (MALDI-TOF);
- Avaliar a atividade antioxidante dos oligômeros através dos ensaios do radical ABTS, atividade quelante de ferro e atividade protetora do DNA;
- Testar a citotoxicidade em linhagens de células normais (endotelial) e tumorais;
- Determinar a toxicidade aguda em camundongos submetidos a tratamento com oligossacarídeos e avaliar o efeito analgésico dos compostos;
- Analisar a ação antineoplásica dos oligossacarídeos de em tumores experimentais em camundongos.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, A. P., HIGUERA, I. Em quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones.. **Programa Cyted**, 2004.
- AJITH, T. A., JANARDHANAN, K. K. Citotoxic and tumour activities of a polypore macrofungus, *hellinusrimosus* (Berck) Pilat. **Journal of ethnopharmacology**, v. 84, p. 157-162, 2003.
- ALLAN, C. R., & HADWIGER, L. A The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. **Experimental Mycology**, 3 ,p 285 e 287, 1979.
- ALLAN, G. G.; ALTMAN, L. C.; BENSINGER, R. E.; GOSH, D. K.; HIRABAYASI, Y.; NEOGI, S. Chitin, Chitosan and Related Enzymes; Zikakis, J. P., ed.; **Academic Press: Orlando**, 1984.
- ANJOS FSC. Filmes e beads à base de quitosana: Incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede. **Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco- Departamento de Química Fundamental**. p 93, 2005.
- ARANAZ, I., MENGÍBAR, M., HARRIS, H., PAÑOS, I., MIRALLES, B., ACOSTA, N., GALED, G., HERAS, A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p.203-230, 2009.
- ARANCIBIA, M.Y.,ALEMÁN, A., CALVO, M.M., LÓPEZ-CABALLERO, M.E., MONTERO, P. GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. **Food Hydrocolloids**, v.35, p.710-717, 2014.
- ARRUDA, L. F. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. 78 f. **Dissertação (Mestrado)** - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- ARVANITOYANNIS, I.S., KASSAVETI, A. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. **Int. J. Food Sci. Technol**, v.43, p.726-745. 2008.
- BARATTÈ, S. B. M. A review of analytical methods for determination of 5-fluoruracil in biological matrices. **Anal Bioanal Chem**, v. 397 (3): p 1191-201, 2010.
- BEZERRA, R. S., VIEIRA, V. L. A., CARVALHO JR, L. B. Proteases no trato digestivo de peixes. Tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o

- aproveitamento de subprodutos na indústria pesqueira. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 22, p 46-49, 2001.
- BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications e comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v.57, p.257-265, 2013
- BRAVO-OSUNA, I., MILLOTTI, G., VAUTHIER, C., & PONCHEL, G. In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, 338(1e2), p 284 e 290, 2007.
- CABRERA, J. C.; CUSTEM, P.V. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acido or enzymatic degradation chitosan. **Biochemical Engineering Journal**, 25, p 165-172, 2005.
- CAHÚ, T.B., SANTOS, S.D., MENDES, A., CÓRDULA, C. R., CHAVANTE, S. F., CARVALHO JR., L.B., NADER, H.B., BEZERRA, R.S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v.47, p.570–577, 2012.
- CALABRESE, V.; LODI, R.; TONON, C.; D'ÁGATA, V.; SAPIENZA, M.; SCAPAGNINI, G.; MANGIAAMELI, A.; PENNISI, G.; STELLA, A. M.; BUTTERFIELD, D. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedrich's ataxia. **Journal of the Neurological Science**, 233: p 145-162, 2005.
- CAMPANA-FILHO, S. P., BRITTO, D., CURTI, E., ABREU, F. R., CARDOSO, M. B., BATTISTI, M. V., SIM, P. C., GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R L. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Revista Química Nova**, v.30, n.3, p. 644-650, 2007.
- CAMPOS-TAKAKI, G. M. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production. In: Dutta, P. K. (ed) Chitin and chitosan opportunities and challenges India, **SSM: International Publication**. 2005.
- CANELLA K. M.N. C E GARCIA R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel influencia do método de preparação e do solvente. **Química nova**, v. 24, n. 1, pp.13-17, 2001.

- CARVALHO, T. U. Cultura de células animais. In: Benchimol, M.; Attias, M.; Cunha-Silva, N. L.; Carvalho, T. U. **Métodos de estudo da célula. Rio de Janeiro. Editoração Eletrônica Fenorte/Uenf**, p. 47-58, 1996.
- CHEN, J., YAMADA, S., HAMA, Y., SHETTY, A.K., KOBAYASHI, T., ODA, H., SEIKI, K., KIM, E., KIMURA, T., TAKAHASHI, N., HIDARI, K. I.P.J., SUZUKI, T., SUZUKI, Y., SUGAHAR, K. Unique heparan sulfate from shrimp heads exhibits a strong inhibitory effect on infections by dengue virus and Japanese encephalitis virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, p.136–142, 2011.
- CHEN, X.; XIA, W.; YU, X. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. CJ22-326. **Food Research International**, 38, 315-322, 2005.
- CIRA, L.A., HUERTA, S., HALL, G.M.; SHIRAI, K. Pilot scale lactic acid fermentaions of shrimp waste for chitin recovery. **Process in Biochemistry**, v.37, p.13-59, 2002.
- COST SILVA H. S.R., SANTOS K. S. C. R. e FERREIRA E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v 29, n.4, p 776-785, 2006.
- COWARD-KELLY, G., AGBOGBO, F.K., HOLTZAPPLE M.T. Lime treatment of shrimp head waste for the generation of highly digestible animal feed. **Bioresource Technology**, v.97, p. 1515–1520, 2006
- DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. **Tese de D. Sc., Universidade Estadual de campinas, SP, Brasil**. 2005.
- DEUCHI, K., KANAUCHI, O., SHIZUKUISH, M., & KOBAYASHI, E.. Continuous and massive intake of chitosan effects mineral and fat-soluble vitamin status in rats fed on a high-fat diet. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, 59, p 1211 e 1216, 1995.
- DOMARD, A.; CARTIER, N. Glucosamine oligomers: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 11, p 297-302, 1989.
- EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. **Berl. Klin. Wschr.** V. 28, p. 871-874, 1905.
- FASANARO, P.; MAGENTA, A.; ZACCAGNINI, G.; GICCHILLITTI, L.; FUCILI, S.; EUSEBI, F.; BIGLIOLI, P.; CAPOGROSSI, M. C.; MARTELLI, F. Cycli D1 degradation enhances endotelial cell survival upon oxidatide stress. **FASEB Journal**, 20, p 1242-1244, 2006.

- FAO. FAO yearbook. **Fishery and aquaculture statistics**. Aquaculture production. FAO, Roma (disponível em www.fao.org), 2012b.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. FAO, Roma (disponível em www.fao.org), 2012a.
- FAO. **The state of world fisheries and aquaculture**. FAO, Roma (disponível em www.fao.org), 2014
- FREITAS, R. R., COSTA, K. G., SILVESTRI, F. Maricultura e Meio Ambiente: tecnologias, impactos e sustentabilidade. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4 (1), p.107-113, 2009.
- FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; BRACCI, N.; GÓRNIK, S. L.; DAGLI, M.L.Z. Possible herb-drugs interactions in cancer treatment. **Brazilian Journal of Toxicology**, v. 21,n.2,p. 49-59, 2008.
- GOY, R.C., ASSIS, O.B.G., CAMPANA-FILHO, S.P.. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, 2004.
- HALL, L.; DIEP, T. B.; NAGASAWA, N.; YOSHII, F.; KUME, T. Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, 208, p 466-470, 2003.
- HE, S., FRANCO, C., ZHANG, W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v.50, p. 289–297, 2013.
- HOWARTH, W. 1996. Trade, the environment and aquaculture. **Aquaculture Asia**, July-September, p.17-23, 1996.
- HURYN, D. M. Drug Discovery in a academic setting: Playing to strengths. **ACS Med. Chem. Lett.** V. 4, p 313-315, 2013.
- ISLAM, M., KHAN, S., TANAKA, M.. Waste loading in shrimp: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments, **Mar. Pollut. Bull**, v. 49, p. 103–110, 2004.
- IZUME, M.; NAGAE, S.; KAWAGISHI, H.; MITSUTOMI, M.; OHTAKARA, A. Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 5 (3), p 448 - 453, 1992.
- JEON, Y. J.; PARK, P. J.; KIM, S. K. Antimicrobial effect of chitoooligosaccharides produced by bioreactor. **Carbohydrate Polymers**. 44, p 71-76, 2001.

- JEON, Y. J., SHAHIDI, F., & KIM, S. K. Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. **Food Reviews International**, 16(2), p 159 e 176, 2000.
- JUNG, W. K., MOON, S. H., & KIM, S. K. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. **Life Science**, p 78, 970 e 976. 2006.
- KANATT, S. R., CHANDER, R., SHARMA A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products **Food Chemistry** 107, p 845–852, 2008.
- KENDRA, D. F., & HADWIGER, L. A. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. **Experimental Mycology** p 8276 e 8281, 1984.
- KIM SK, RAJAPAKSE N. Enzymatic production na biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): **A review**.;62: p 357-368, 2005.
- KIRCHNER, T., KIRCHNER T., MÜLLER S, HATTORI T, MUKAISYO K, PAPADOPOULOS T, BRABLETZ T, JUNG A. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early câncer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. **Virchows Archiv**, v. 439, n. 4, p. 512-522, 2014.
- KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and functioal polymers**, p 46,1-27, 2000.
- KUMAR, A. B. V. & THARANATHAN, R.N. A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes **Carbohydrate Polymers** 58 p 275–283, 2004.
- KUO, C. H.; CHEN, C.C.; CHIANG B. H. Properties process characteristics of hydrolysis of chitosan in a continuous ezymatic membrane reactor. **JFS E: Food Engineering and Physical**, 69, p 332 - 337, 2004.
- KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress In polymer sciece**, 26, p 1921-1971, 2001.
- LEE, J. S.; PYUN, Y. R.; BAE, K. S. Transfer of *Bacillus ehimensis* and *Bacillus chitinolyticus* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptios *Paenibacillus ehimensis* comb. Nov. and *Paenibacillus chitinolyticus* comb. Nov. **International Journal of Systematic na Evolutionary Microbiology**, 54, p 929-933, 2004.

- LIAO, F. H., SHIEH, M. J., CHANG, N. C., & CHIEN, Y.W. Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients. **Nutrition Research**, 27(3), p 146 e 151, 2007.
- LIU, Z. H.; ZENG, S. Cytotoxicity of ginkgolic acid in HepG2 cells and primary rat hepatocytes. **Toxicology Letter**, p 131-136, 2009.
- LOEWENTHAL, H.; JAHN, G. Übertragungsversuche mit carcinoma toser mause ascites flüssigkeit und ihr verhalten gegen physikalische und chemische einwirkungen. **Ztschr F Krebsforsch**, v. 12, p 37-439, 1932.
- MAEDA, Y.; KIMURA, Y. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. **Nutritional and Cancer**, 134, p 945-950, 2004.
- MAEZAKI, Y., TSUJI, K., NAKAGAWA, Y., KAWAI, Y., AKIMOTO, M., TSUGITA, T. Chitin enzymology. **Italy: Lyon and Ancona: European Chitin Society**. p. 217 e 23, 1996.
- MALET-MARTINO, M., MARTINO, R. Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluoruracil (capecitabine, UFT, S-1): a review. **Oncologist**, v.7(4): p 288-323, 2002.
- MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; SÁNCHEZ, J.J. Fishery byproduct media as a nutrient source for bacteria and archaea growth. **Bioresource Technology**, v. 96, p.383-387, 2005.
- MENDIS, E.; KIM, M.M.; RAPAJAKSE, N.; KIM, S. In vitro cellular analysis of radical scavenging efficacy of chitoooligosaccharides. **Life Sciences**, 80, p 2118-2127, 2007.
- MEZZOMO, N., MAESTRI, B., SANTOS, R.L., MARASCHIN, M., FERREIRA, S.R.S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, p. 1383–1391, 2011.
- MING, M.; KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; SATO, S.; MUKATAKA, S. Production of chitosan oligosaccharides by chitosanase directly immobilized on an agar gel-coated multidisk impeller. **Biochemical Engineering Journal**, 28, p 289-294, 2006.
- MONTEIRO JUNIOR AO. Preparação, modificação química e calorimétrica do biopolímero quitosana. **Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas-Instituto de Química de Campinas**. p 101, 1999.

- MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção pesqueira e aquícola: estatística** 2009, 2010 e 2013
- MUZZARELLI, R.; XIA, W.; TOMASETTI, M.; ILARI, P. Depolymerization of chitosan and substituted chitosans with the aid of a wheat germ lipase preparation. **Enzyme and Microbial Technology**, 17, p 541 – 545, 1995.
- NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure and Applied Chemistry**, 74, p 1245-1251, 2002.
- NO, H. K., PARK, N. Y., LEE, S. H., & MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, 74(1e2), p 65e72, 2002.
- OKAMOTO, Y.; SHIBAZAKI, K.; MINAMI, S.; MATSUHASHI, A.; TANIOKA, S.; SHIGEMASA, Y.; J. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs **Vet. Med. Sci.**, 5, p 851, 1995.
- PANDIAN, R. P.; KUTALA, V. K.; LIAUGMINAS, A.; PARINANDI, N. L.; KUPPUSANNY, P. Lipopolysaccharides-induced alterations in oxygen consumption and radical generation in endothelial cells. **Molecular and cellular Biochemistry**, 278, p 199-127, 2005.
- PANTALEONE, D.; YALPANI, M.; SCOLLAR, M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, 237, p 325–332, 1992.
- PARK, J. H., SARAVANAKUMAR, G. S., KIM, K. Y., & KWON, C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 62(1), p 28 e 41, 2010.
- PARK, P. J., JE, J. Y., & KIM, S. K. Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, p 4624–4627, 2003a.
- PETER, M.G. Chitin and chitosan from animal sources. In: STEINBUCHER, A.; RHEE,SK. **Polysaccharides and polyamides in the food industry**. Weinheim: Wiley-vch. V.1.p 115-208, 2005.
- PRASHANTH, K.V. H., THARANATHAN, R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential -an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.117-131, 2007.

- QI, L., XU, Z. In vivo antitumor activity os chitosan nanoparticles. **Bioorganic Med. Chem. Leteres.** V. 16, p. 4243-4245, 2006.
- REITZ, A. B. Future horizons in drug Discovery research. **ACS Med. Chem. Lett.** V.3, p. 80-82, 2013.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos.** São Paulo: Edgard **Biucher**, 2ed, p 18, 2007.
- RINAUDO, M.,. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- ROCHA, I.P., RODRIGUES, J., AMORIM, L. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 30, 2004.
- RODRÍGUEZ-PEDROSO, A.T., RAMÍREZ-ARREBATO, M.A., RIVERO-GONZÁLEZ, D., BOSQUEZ- MOLINA, E., BARRERA-NECHA, L.L., BAUTISTA-BAÑOS, S. Propiedades quím ico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. **Revista Chapingo Serie Horticultura**,v. 15(3), p. 307-317, 2009.
- RONCAL, T.; OVIEDO, A.; ARMENTIA, I. L.; FERNANDEZ, L.; VILLARÁN, M. C. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis high deacetylation degree chitosan. **Carbohydrate Research**, 342, p 2750-2756, 2007.
- SANTOS, S. D; CAHÚ, T. B.; FIRMINO, G. O.; CASTRO, C. M. M. B, CARVALHO JR, L. B., BEZERRA, R. S. LIMA FILHO, J. L. Shrimp waste extract and astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. **Journal of Food Science**, v.77, n.7, p.41-46, 2012.
- SALAH, T.A., MOHAMMAD, A.M., HASSAN, M.A., EL-ANADOULI, B. E. Development of nano-hydroxyapatite/chitosan composite for cadmium ions removal in wastewater treatment. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 2013.
- SANSONE, F., PICERNO,P., MENCHERINI, T., PORTA, A., LAURO, M. R., RUSSO, P, AQUINO, R. P. Technological properties and enhancement of antifungal activity of a *Paeonia rockii* extract encapsulated in a chitosan-based matrix. **Journal of Food Engineering**, v.120, p. 260–267, 2014.
- SEKIGUCHI, S., MIURA, Y., KANEKO, H., NISHIMURA, S. I., NISHI, N., IWASE, M. Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. In K.

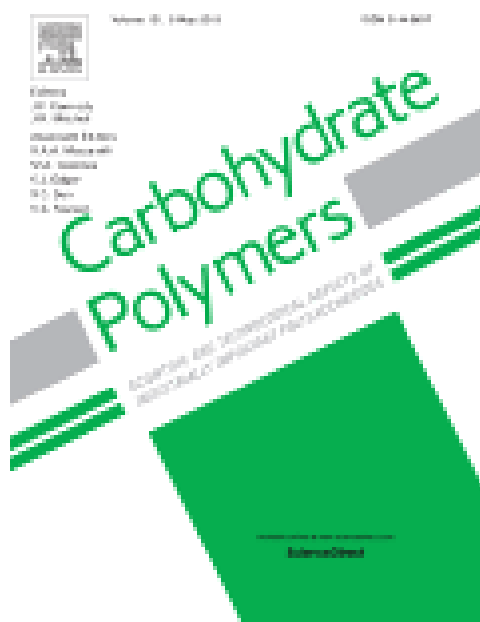
- Nishinari, & E. Doi (Eds.), **Food hydrocolloids: Structures, properties, and functions** New York: Plenum .p 71e76, 1994.
- SHABEL, F. Qualitative evolution of anticâncer agente activity in experimental animals. **Pharmacololy and therapheutics**. V.1, p. 411-435, 1977.
- SHI, C., ZHU Y., RAN, X., WANG M, SU Y, CHENG T. Therapeutic potential of chitosan and its derivates i regenerative medicine. **Journal of surgical research**, v. 133, p. 185-192, 2006.
- SHIGEMASA, Y.,. MINAMI, S. Application of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotech. Genet. Eng. Rev.**, 13 p 383–420, 1996.
- SINSWAT, P., & TENGAMNUAY, P. Enhancing effect of chitosan on nasal absorption of salmon calcitonin in rats: comparison with hydroxypropyl- and dimethyl-b-cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, 257(1e2), p 15 e 22, 2003.
- SILVA, H. S. R. C., SANTOS, K. S. C. R, FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.
- SKAUGRUD, O.; SARGET,G. Chitin and chitosan: Crustacean Biopolymers with potential. In: INTERNATIONAL BY- PRODUCTS CONFERENCE, 1992, **Alaska. Proceedng...** Anchorage, Alaska,. p .61-72, 1992.
- STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; NETO, B. B.; CAMPOS-TAKAI, G. M. Growth of Cunninghamella elegans UCP 542 and prduction of chitin and chitosan using yan bean médium Elect. **J. Biotech.**; p 10:15. 2007.
- STOYACHENKO, I. A., VARLAMOV, V. P. Chitinases of Streptomyces kurssanovii: purification and some properties **Carbohydrate Polymers** 24 p 47-54, 1994.
- SUDARSHAN, N. R., HOOVER, D. G., & KNORR, D. Antibacterial action of chitosan. **Food Biotechnol** p 6257 e 6272, 1992.
- SUGANO, M., FUJIKAWA, T., HIRATSUJI, Y., NAKASHIMA, K., FUKUDA, N., & HASEGAWA, Y. A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. **American Journal of Clinical Nutrition**, 33, p 787 e 793, 1980.
- SUGANO, M., WATANABE, S., KISHI, A., IZUME, M., & OHTAKARA, A. Hypocholesterolemic action of chitosans with different viscosity in rats. **Lipids**, 23(3) p 187 e 191, 1988.

- SUZUKI, K.; MIKAMI, T.; OKAWA, Y.; TOKORO, A.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitoheaoase. **Carbohydrate Research**, 151, p 403-408, 1986.
- THANOOU, M., VERHOEF, J. C., & JUNGINGER, H. E. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 50(S1), p 91e 101, 2001.
- TOKORO, A., TATEWAKI, N., SUZUKI, K., MIKAMI, T., SUZUKI, S., & SUZUKI, M. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 36, p 784 e 790, 1988.
- TOMMERAAS, K.; VARUM, K. M.; CHRISTENSE, B. E.; SMIDSRØD, O. Preparation and characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, 333, p 137-144, 2001.
- TSUKADA, K.; MATSUMOTO, T.; AIZAWA, K.; TOKORO, A.; NARUSE, R.; SUZUKI, S.; SUZUKI, M. Antimetastatic and growth-inhibitory effects of Nacetylchitohexaose in mice bearing lewis lung carcinoma. **Japanese Journal of Cancer Research**, 81, p 259 -265, 1990.
- UCHIDA, Y., LZUME, M., & OHTAKARA, A. Preparation of chitosan oligomers with purified chitosanase and its application. In G. Skjak-Brak, T. Anthonsen, & P. Sandford (Eds.), *Chitin and chitosan: Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications* **London: Elsevier**. P 373 e 382, 1989.
- VISNOVA, J. e VAVRIKOVA, E. **Recent advances in drugs and prodrugs design of chitosa. Curret Pharmaceutiical Design**, v. 14, p. 1311-1326, 2008.
- WEI, X. L., & XIA, W. S. Research development of chitooligosaccharides physiological activities. **Chinese Pharmaceutical Bulletin**, 19(6), p 614 e 617, 2003.
- XIA, W. S. Physiological activities of chitosan and its application in functional foods. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 3(1), p 77 e 81, 2003.
- XIE, W., XU, P., LIU, Q. Antioxidant Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, 11, p 1699-1701, 2001.

- XU, Q.; DOU, J.; WEI, P.; TAN, C.; YUN, X.; WU, Y.; BAI, M. A, X.; DU, Y. Chitooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Bax. **Carbohydrates Polymers**, 71, p 509-514, 2008.
- YANG, E-I., YI, S-T., LEEM, Y-M. Effect of oyster shell substituted for fine aggregates on concrete characteristics: part I. Fundamental properties. **Cement and Concrete Research**, v.35, p. 2175–82. 2005.
- YEN, M-T., YANG, J-H, MAU, J-L. Antioxidant properties of chitosan from crabshells. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 840–844, 2008.
- ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on microbial activity of chitosan with differet molecular weights. **Carbohydrate Polymers**. 54, p 527-430, 2003.
- ZHAO, X. R., & XIA, W. S. Antimicrobial activities of chitosan and application in food preservation. **Chinese Food Research and Development**, 27(2), p 157 e 160, 2006.
- ZHOU, K., XIA, W., ZHANG, C., & YU, L. In vitro binding of bile acids and triglycerides by selected chitosan preparations and their physicochemical properties. **LWT- Food Science and Technology**, 39, p 1087 e 1092, 2006.
- ZOHURIAAN-MEHR, M. J. Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: **A comprehensive review**. **Iranian Polymer Journal**, v. 14, n. 13, p. 235-265, 2005.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos do trabalho experimental dessa dissertação são apresentados no artigo intitulado **“Production, characterization and evaluation of antioxidant and antitumor activities of chitoligosaccharides obtained from chitosan of marine shrimp *litopenaeus vannamei* processing waste”** que se encontra anexado e será submetido à Revista Carbohydrate Polymers.



Qualis A2

ISSN: 0144-8617

Fator de Impacto: 3.479

Production, characterization and evaluation of antioxidant and antitumor activities of chitoligosaccharides obtained from chitosan of marine shrimp *litopenaeus vannamei* processing waste

Milena M. Silva^a, Thiago B. Cahú^a, Raquel P. F. da Silva^a, José Guedes da Silva Júnior^b,
Teresinha G. da Silva^c, Vera L. de Menezes Lima^b e Ranilson S. Bezerra^a.

^aLaboratório de Enzimologia (LABENZ) Department of biochemistry. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

^bLaboratório de Lipídeos e Biomoléculas e suas aplicações em Doenças Prevalentes e Negligenciadas Department of biochemistry. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

^cLaboratório de Farmacologia e Toxicologia Aplicada. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Author: Ranilson S. Bezerra

Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.

Tel, +55 81 21268540; Fax, +55 81 21268576

email: ransoube@uol.com.br

ABSTRACT

The production of chitoligosaccharides is an effective way to improve the chitosan solubility and decrease its viscosity, thereby enhancing its potential application. This work aimed to produce and characterize chitosan oligosaccharides obtained from processing residues of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* and evaluate its antioxidant, cytotoxic, acute toxicity, analgesic and antitumor activity. Chitosan was produced from shrimp heads by enzymatic autolysis and alkaline deacetylation method, followed by nonspecific enzymatic hydrolysis using pepsin to obtain chitoligosaccharides and low molecular weight chitosan. Infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (^{13}C NMR) and mass spectrometry (MALDI-TOF) was performed for sample characterization. Assays of ABTS, reducing and chelating potential of Fe^{2+} and protection of DNA submitted to Fenton were performed to determine the antioxidant potential. The cytotoxicity was evaluated using NCI-H292, HT-29, MCF-7 and Hep-2 human tumor cell lines and endothelial normal cells from rabbit aorta (RAEC). Acute toxicity of these compounds was tested in mice, as well as the analgesic and antitumor activity *in vivo*. Oligosaccharides showed complete solubility and low viscosity in neutral aqueous media. The FT-IR and NMR spectra profile was similar to that of chitosan. MALDI-TOF analysis showed that oligosaccharides molecular weight is between 0.8 and 2.6 kDa. The antioxidant activity for ABTS was of 37.94%, chelating abilities on ferrous ion was of 22.38% at 1 mM and exhibited DNA protection for 100 μM . COS did not show cytotoxicity towards RAEC and presented low inhibition against tumor cell lines at a concentration of 25 μM . The compounds showed analgesic activity dose dependent and interesting ability to tumor inhibition *in vivo*. For Ehrlich carcinoma tumors COS inhibited 61.8% while for sarcoma 180, COS inhibited 63.1%, of the growth of tumor in mice. These results show the efficiency of these oligomers obtained from shrimp waste heads, which have similar structures to those of chitosan, allowing the improvement of its

properties. Future studies are important to determine clearly the biological activities of these compounds.

Keywords: By-products of the fishing industry; chitosan; oligosaccharides; antioxidant activity; cytotoxicity; acute toxicity; analgesic activity; antitumor activity

1.Introduction

Due of the growth of world fishery production, the fishing industry has generated large amounts of waste and by-products. It is estimated that approximately 50% of the produced fish to be discarded as residue (ARRUDA, 2004)

Considering that in 2012 were produced 158 million tons of fish in the world (FAO, 2014), this would amount 79 million tons of waste. These by-products, although highly biodegradable, their excessive accumulation in the environment associated with the its perishable nature, generates a social problem order, as a hazard for public health (CIRA et al , 2002; MARTONE et al., 2005; ROCHA, et al., 2004). The generation of such materials encourages the search for alternative ways of utilization, in order to avoid environmental pollution and loss of interesting bioactive molecules.

Chitin, the second most abundant polysaccharide in nature, is obtained primarily from shrimp and crab by-products (shells). From deacetylation of chitin is obtained chitosan, which is a more soluble, polycationic and non-toxic biopolymer, being found in the cell walls of fungi and yeast (SHAHIDI AND ABUZAYTOUN, 2005). Chitosan is known to exhibit a wide variety of physiological activities such as antitumor (QIN et al., 2002), antimicrobial (YANG et al., 2005) and antimutagenic activity (KOGAN et al . , 2004).

However, the low solubility of chitosan and the high viscosity of its solutions due to its high molecular weight constitute disadvantages for many biological and technological applications. The production of chito-oligosaccharides (COS) is an effective way to improve the solubility of chitosan and decrease the viscosity of its solution enhancing, the potential as functional materials for biotechnological applications (MENGÍBAR et al, 2013).

Among the methods already described for producing COS, enzymatic hydrolysis is known to be performed under mild conditions, and unlike of acid hydrolysis, for example, presents as a more specific process that allows control of the reaction during the process and thus of the degree polymerization of generated oligomers (KIM & RAJAPAKSE, 2005; MING et al , 2006; RONCAL et al , 2007; KUO, CHEN & CHIANG, 2004).

However, COS production by enzymatic means, in which use specific enzymes is limited due to the absence of a steady and efficient production chitosanases to ensure a low-cost process. Alternatively, studies were conducted using non-specific enzymes which diminish the production cost for successful production of these oligomers (CABRERA & CUTSEM, 2005; RONCAL et al., 2007). The enzymatic hydrolysis carried out by nonspecific enzymes have been described in the literature as an effective alternative to obtain oligosaccharides and polymers with lower molecular weight. It is attractive for the feasibility compared to specific enzymes. As a consequence, some researchers have studied nonspecific commercial enzyme (PANTALEONE, YALPANI & SCOLLAR, 1992), as these have been used in the food industry for many years and are relatively safer and less costly.

Oligosaccharides obtained from the hydrolysis of chitosan have aroused much interest. not only because COS and low molecular weight water soluble, but they also have a lot of functional properties including anti-tumor (HARISH & PRASHANTH THARANATHAN., 2005; HUANG et al , 2006), antioxidant (CHEN et al , 2003), elimination of free radical (JE et al , 2004; PARK et al 2003), the anti-hepatotoxic (CHEN et al., 2005a), and anti-angiogenesis activities (HARISH PRASHANTH AND THARANATHAN, 2005).

This work aimed to study the COS produced from shrimp processing waste and evaluate its properties, characterization, its antioxidant potential, its acute toxicity, its analgesic action and its antitumor activity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Processing waste (cephalothorax and carapace), from *L. vannamei* juveniles heads (total body weight between 10 g and 12 g) were provided by a local fishery processing plant (EMPAF Ltd.). Fresh heads were immediately stored on ice (0 °C) and transported to the laboratory where they were packed in plastic bags (1 kg per bag) and stored at -20 °C until use. Only analytical-grade reagents were used: 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfonic acid monosodium salt hydrate (ferrozine), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX), trimethylamine-sulfur trioxide, monochloroacetic acid and pepsin from gastric porcine were purchased from Sigma Chemical Co. All other chemicals and reagents used in this study were of analytical grade and commercially available.

2.2. Chitosan from marine shrimp processing waste

Shrimp heads were mixed with distilled water at a ratio of 1 kg of wet raw-material to 1 L of distilled water and grinded in an industrial food processor (Engefrio, Recife, Brazil). Then, the mixture was hydrolyzed, according to the method of Leal et al . (2010). for *L.vannamei*, without the addition of any commercial proteases, in a vessel placed in a water bath at 40 °C for 2 h with constant stirring (700 rpm). The preparation was then heated for 10 min at 100 °C and filtered (1 mm² mesh) to retain the head carapace (solid phase) used for chitin extraction and chitosan (CH) production, using the previously described method by Cahú et al . (2012).

2.3. Production of Chitoligosaccharides

Chitoligosaccharides (COS) were obtained by enzymatic hydrolysis with pepsin from gastric porcine, according to Roncal et al., (2007) with slightly modifications. Briefly, chitosan

(1%) in 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.5 and pepsin were incubed (1:100) in a water bath at 40°C for 20h. After this, pH was adjusted to 7.0 with 1 M NaOH and the reaction was boiled for 10 min to inactivate the enzyme and centrifuged. The supernatant was freeze dried and resuspended with methanol, and then precipitated and washed with 2 vol of acetone, and finally dried under vacuum.

2.4 Characterization

Chitoligosaccharides were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), Nuclear magnetic resonance (NMR) and Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF). Decoupled ^{13}C NMR spectra were obtained using a Bruker Avance DRX-400 spectrometer with a 5-mm inverse probe. ^{13}C NMR acquisitions were performed using the WALTZ-16 pulse sequence with the following parameters: FIDRES: 0.8466 Hz; AQ: 0.5906 s; DW: 15.75 s; DE: 5.5 μs ; D1: 110 ms; D2: 3.4 ms; PL12: 17 dB (decoupler 1H). FT-IR spectra were measured in KBr pellets in transmission mode within a range of 4000–500 cm^{-1} using an FT-IR Bomem MB100 spectrophotometer. The molecular weight of Chitoligosaccharides obtained from the enzymatic hydrolysis of chitosan was determined by MALDI-TOF MS analysis (Voyager-DE TM STR Biospectrometry Workstation, Applied Biosystems Inc., NCIRF, Korea) The degree of deacetylation (DD) were calculated by infrared spectra, according $100 - ((A_{1320}/A_{1420} - 0.3822)/0.03133)$ by Brugnertto et al . (2001).

2.5 Antioxidant activities

2.5.1 ABTS:

To determine the antioxidant activity, radical reduction method ABTS $\bullet$ + was used the method described by Re et al., (1999). Initially formed ABTS $\bullet$ + radical, from reacting 5 ml of a 7 mM ABTS $\bullet$ + 88 μL of a solution with 2.45 mM potassium persulphate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), was incubated with COS at room temperature and absence of light for 16 hours. Elapsed this

time, the solution ABTS • + was diluted in ethanol to obtain a solution with absorbance of 0.70 ($\pm$ 0.05) at 734 nm. Prepared in triplicate, the final concentrations of COS and standard 10, 8, 6, 4, 2.1, 0.5 and 0.05 mM. In absence of light, 20 μ L of each concentration of COS and standards in test tubes with 2000 μ L of the ABTS radical • +, reading the absorbance was held in six minutes in a spectrophotometer. The results were expressed as average of three replicates ($n = 3$), as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and calculated percentage inhibition of the oxidation, using the following equation: $\% = (\text{control} - \text{samples} / \text{control}) \times 100$.

2.5.2 Ferrous ion (Fe^{2+}) chelating activity:

The Fe^{2+} ion chelant activity was determined by Decker and Welc et al. (1990) with modifications. 100 μ L of samples at different concentrations (0.05; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 6.0; 8.0; 10.0 mM), were mixed to 100 μ L of distilled water. Then 25 μ L of 0.5 mmol/L FeCl_2 solution and 25 μ L of 2.5 mmol/L ferrozine solution were added. This mixture was kept at room temperature for 20 minutes and the absorbance was read at 550 nm. Distilled water was used as control. The chitosan chelant activity was expressed by the following equation: $\text{HCA} (\%) = [1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})] \times 100$.

2.5.3 DNA nicking assay

The DNA nicking assay was performed using pBR 322 plasmid DNA. The reaction mixture contained 0.3 μ L of plasmid DNA, 10 μ L of Fenton's reagent (30 mM H_2O_2 , 50 mM ascorbic acid, and 80 mM FeCl_3) followed by the addition of COS In different concentrations (400, 200, 100 μ M). The final volume of the mixture was brought up to 200 μ L using distilled water. The mixture was then incubated for 30 min at 37 C and the DNA was analyzed on 1% agarose gel (KAUR et al., 2008). The measurement of DNA damage protection was analyzed by TotalLab Quant.

2.6 Antitumor activity in vitro/Cytotoxicity assay

The cytotoxic activity was performed using the MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) method (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). Human tumor cell lines NCI-H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma), HEp-2 (human laryngeal carcinoma), HT-29 (human colon cancer) and human mammary carcinoma cells (MCF-7), maintained in DMEM medium culture. The media was supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin). The cells were maintained in an incubator at 37 ° C in a humid atmosphere enriched with 5% CO₂.

The NCI-H292 cells, HT-29, and Hep-2 (10⁵ cells/ml) were plated in 96 well plates and incubated for 24h. Then the samples dissolved in DMSO (0.5%) were added to the wells at final concentration of 25 µM. The drug doxorubicin (5 mg/mL) was used as standard. After 72 h reincubation was added 25 µL of MTT (5 mg/ml) and after 3 h incubation, the culture medium with MTT was aspirated and 100 µL of DMSO was added to each well. The absorbance was measured in a microplate reader at a wavelength of 560 nm.

Endothelial cells (RAEC) derived from rabbit aorta used in this study (Colburn & Buinassisi, 1982) were grown in F-12 medium (Gibco BRL, Grand Island, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) in the presence of penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Cells were grown at 37°C in a humidified, 2.5% CO₂ atmosphere and sub-cultured every week with Pancreatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells (8 x 10³) were subcultured in 96-well plates until confluence and then exposed to different concentrations of chitosan oligosaccharides diluted in F-12 medium for 24 h. After that, the medium was aspired and 0.2 mL of F-12 medium containing 1 mg/mL MTT was added the reaction was allowed for 2 h in culture conditions. Afterwards, the medium was removed and 0.1 mL of dimethylsulfoxide was added to lyse cells and dissolve formazan crystals. The solution was homogenized in a plate

shaker and the absorbance was read in 540 nm. The experiments were performed in sextuplicate and the percent inhibition was calculated with the GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

2.7 Assessment of acute toxicity

Increasing doses (500, 1000, 2000 mg/kg) were administered orally in 5 mouse per group (US Environmental Protection Agency, 1992). On the first day, the animals were observed every 10 minutes for 4 hours, followed by two daily observations after administration of 24 hours, 48 hours and 72 hours to observe possible changes in spontaneous motor activity, reflects, motion, respiration, contortions and piloerection plus mortality.

2.8 Analgesic Activity: Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of diluted acetic acid

Abdominal constrictions were induced by intraperitoneal injection (0.8% acetic acid), according to the procedures described for Schneider, et al.,(1968) with minor modifications. Animals were pre-treated with COS (100, 200, 400 mg/kg) or standard drugs (ASS) , intraperitoneally, 1 hour prior to acetic acid injection. The control animals received a similar volume of 0.9% NaCl (10 mL/kg, i.p.). After the challenge, each mouse was placed in a separate glass funnel and the number of contractions of the abdominal muscles, together with stretching, was cumulatively counted over a period of 20 min. Antinociceptive activity was expressed as the reduction in the number of abdominal contractions, comparing the control animals with the mice pretreated with COS.

2.9 Antitumor activity in vivo

2.9.1 Animals

For the evaluation of antitumor activity, were used Swiss albino mice (*Mus musculus*) males, aged 35-60 days and average weight of 35 g, obtained from the animal house of the

Department of Biochemistry-UFPE. The animals were kept at room temperature (28°C) and natural day/night cycle (12h light and 12h dark) with free access to food and water.

2.9.2 Treatment

Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma were used as models of experimental tumors, from the Academic Center of Vitória (CAV-UFPE). Tumors were transferred and maintained in the ascitic form in mice every seven days. Tumor cells were implanted subcutaneously in the right axillary region of the mice at a concentration of $2.5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ thus developing tumors in solid form. After 24 hours implantation of tumors was initiated the treatment which lasted seven days. Twenty four animals were used for each type of tumor; each experimental group consisted of eight animals. The animals received the solutions containing the COS concentration of 400 mg/kg day body weight by intraperitoneal injections. COS were prepared in saline 1%. The negative control animals received only saline and the positive control received 5-fluorouracil chemotherapy in equal conditions.

2.9.3 Tumor weight

Twenty-four hours after the last drug administration, the mice were anesthetized with urethane (1.25g/kg). Tumors were removed, dissected and weighed. Inhibition was determined from the average weight of animals treated groups compared to the untreated control group. The assessment of tumor inhibition (TWI%) was performed by calculating: $\text{TWI} = ((\text{TC}) / \text{C}) \times 100$, where C: average tumor weight of negative control group, T: average weight of the tumors treated.

3. Results and Discussion

3.1 Production of Chitoligosaccharides

Chitosan oligosaccharides were obtained from by non-specific enzymatic hydrolysis using pepsin, as proposed by Roncal et al.(2007) who obtained hydrolysis efficiency comparable

to chitosanase. Among the enzymes studied, pepsin was the one with better performance in its action, reducing the viscosity of chitosan solution by 60% in just 10 minutes, combined with formation of reducing terminals which are resulting from the hydrolysis of polysaccharides in question, in 3.32 to 0.43 mM in 20 hours of reaction. When compared with the performance of the specific enzyme, that is chitosanase, this reduced the viscosity of the solution 65 to 96% in 20 hours, and generating reducing end of 0.41 to 5.46 mM, while no monomer was produced.

Corroborating these results, Kumar and Tharanathan (2004), analyzed the depolymerization reaction of chitosan using some non-specific enzymes. As a result, kinetic parameters obeyed Michaelis-Menten kinetics and K_m and V_{max} values indicated high affinity of pepsin to chitosan. Although chitosanase is found in a variety of microorganisms, its utilization is still limited due to the lack of a steady and efficient production which ensures that the process is more feasible. It is not entirely clear the mechanism which pepsin hydrolyzes chitosan, but studies have shown that chitosan solutions show markable decrease in viscosity when hydrolysed by pepsin,, thus suggesting that pepsin operates in this polysaccharide as an endoglucosidase reducing its molecular mass. From the enzymatic hydrolysis were obtained two types of molecules: Low molecular weight chitosan and chitosan oligosaccharides.

3.2 Characterization of Chitoligosaccharides

The characterization of chitosan and enzymatic hydrolysis products (low molecular weight chitosan and chitooligosaccharide) was performed by infrared spectroscopy (FT-IR), nuclear magnetic resonance (NMR) of ^{13}C and mass spectrometry (MALDI-TOF).

Spectroscopy in the infrared region allows to observe and classify some bands related to the characteristic vibrations of functional groups present in the structure of chitosan, low molecular weight chitosan (LMWC) and chitooligosaccharide (COS). The FT-IR graphics

obtained for chitosan and the products of enzymatic hydrolysis of chitosan (LMWC and COS) (Fig 1) showed a broad peak near 3400 cm^{-1} in the region corresponding to the OH stretch, which appears superimposed axial deformation of the amine group band ($-\text{NH}$) (NUNTHANID et al., 2001). The peak near 2888 cm^{-1} represents $-\text{CH}$ group stretch and peak around 1661 and 1671 cm^{-1} are assigned to the vibrations of the amide I group and corresponds to $\text{C}=\text{O}$ stretching, indicating that remained acetylated units (FIGUEIREDO, 2002). The peak around 1370 cm^{-1} indicates stretch $\text{C}-\text{O}$ of the primary alcohol group ($-\text{CH}_2\text{OH}$). The axial deformation of amide CN appears around 1428 cm^{-1} peak. The intense band between 800 and 1200 cm^{-1} is related to the presence of pyranoside rings (SHIGEMASA et al., 1996). This last band was not intense in the spectrum for COS, which shows less pyranoside rings relative to chitosan and chitosan of low molecular weight.

From the FT-IR, using the relation between the absorbance in the wavelengths 1655 and 3450 cm^{-1} , it was possible to estimate the degree of deacetylation of these biomolecules. This analysis is considered one of the main parameters to characterize chitosan. The degree of deacetylation is defined as the number of amine groups in relation to the number of amide groups in the polymer chain. As a result, the CH showed 81.02%, LWMC 80.68% and COS 81.58% degree of deacetylation (Table 1).

The ^{13}C spectra of chitoligosaccharides are displayed in Fig. 2 The peak at 178.8 correspond to $\text{C}=\text{O}$, at 104 ($\text{C}1$), 58.8 and 57.2 ($\text{C}2$). $\text{C}3$ and $\text{C}5$, which appear as a single signal at 72.8 and 74.6 . 64 ($\text{C}4$) and 63.2 ($\text{C}6$). This profile was similar to that described by Cahú et al (2012), found for marine shrimp chitosan of *Litopenaeus vannamei*.

The chitosan, chitosan low weight molecular and chitoligosaccharides was analyzed by MALDI-TOF-MS. In the case of chitosan no spectra were detected because of high molecular weight and difficult to ionize. The low molecular weight chitosan when analyzed

showed a molecular weight of approximately 21 kDa (Fig 3). MALDI-TOF for COS clearly shows 9 peaks corresponding to the glucosamine oligomers with degree of polymerization (DP) 5 to 16 were monitored in the spectrum. The mass/charge (m/z) of the main peaks were 811.280, 972.376, 1133.455, 1336.531, 1455.571, 1658.631, 2099.827, 2183.817 and 2667.038, respectively. Nine peaks were all $[M+Na^+]$ ion-peaks with approximately 161 or 203 Da mass larger than the peak ahead, which was the molecular mass of a GlcN and GlcNAc residue respectively as it was reported by Li et al .(2012). To summarize, this analysis displayed that the distribution of COS ranged from 5 to 16-mers consisted of a mixture of saccharides of 0,811-2,66 KDa, showing a marjor weight of 1.13 KDa, which suggests that the sample in composed by heptamers (DP 7)(Tale 2).

3.3 *In vitro* antioxidant activity

Chitoligosaccharides proved to be a promising source of antioxidant compounds as shown in Fig. 5. One of the most used methods to measure activity antioxidant is by capturing the radical 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulfonic acid) (ABTS. +), which is generated by a chemical reaction.

The antioxidant activity by radical reduction method ABTS of COS in function of concetration is shown in Fig 5 A and in Table 3, with oxidative inhibition of 48,56%, 10mg/ml, in 6 min, equivalent to TEAC of 1229,17 μ M Trolox. The COS showed significant antioxidant activity as a function of concentration, reaching a percentage inhibition of 37,06% (TEAC of 1010 μ M Trolox) at a concentration of 50 μ g/ml in 6 min of reaction. Inhibition was gradually increased at higher concentration of COS.

Reactive oxygen species (ROS) and/or reactive nitrogen species (RNSs) are generated by normal metabolic processes in all aerobic organisms. However the overproduction of these species may hamper cellular antioxidant defenses and lead to oxidative stress. Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of several diseases by various mecanisms,

which may involve DNA mutations, protein oxidation and lipidic peroxidation (FINKEL & HOLBROOK, 2000; VALKO & COLS, 2004; 2006; 2007). In some diseases, treatments involving antioxidants have shown to be effective in reducing oxidative stress markers leading to growing interest in the progression of world development to explore effective antioxidants especially of natural origin (MENDIS et al., 2007). The free radical scavengers are preventive antioxidants and the presence of these compounds can inhibit the oxidative sequences at different levels (KIM & RAJAPAKSE, 2005). Thus way for the interest in discovering new compounds that are potential antioxidants that may help prevent or even be used in therapy of certain diseases (BANDONI & CZEPAK, 2008).

Zhao et al.(2013) reports that chitosan oligosaccharide and its derivatives showed a higher scavenging effect than chitosan and its derivatives. This study suggest that chitosan and its derivatives exhibited a stronger H bonding. The strong effect of intramolecular hydrogen bonds weakens the activities of hydroxyl and amino groups. The amount and the activity of hydroxyl and amino groups are important factors associated with antioxidant activities of chitosan derivatives and chitosan oligosaccharide elicited the highest scavenging effect because no active groups were substituted (XIE, et al., 2011)

The ferrous ion-chelating effect of COS was related as shown in Figure 5B. The COS showed moderate abilities, concentration-dependent of chelating ability. The COS in 10 mg/ml reached 50% of ability to chelate iron ions. COS, when compared with antioxidant pattern, with the exception of EDTA, achieved better ability to chelate iron ion top citric acid and gallic acid have achieved 24.65 and 24.65% respectively for ability to chelate iron ions. It is reported that the transition metal ions, promotes lipid peroxidation giving starts a chain reaction that can promote the deterioration of food and be correlated with the pathogenesis of various human diseases. Chitosan and their derivatives possess the ability to

inhibit effective pre-oxidant activity of iron ions by converting the ferric ion to ferrous ion, thus retarding the oxidation of lipids (MAGALHÃES et al., 2008).

According to results by Mengibar (2013) the effect of low molecular weight COS on the easy reaction of hydroxyl and amine groups with different radicals and with the capacity to donate electrons and reduce Fe^{3+} .

This increased antioxidant activity of compounds with lower molecular weight is reported by Tomida et al (2009), Huang et al (2012) and Mengibar (2013). Mengibar (2013), analyzed the chelating activity of COS iron produced by enzymatic hydrolysis with chitosanase and lysozyme. This study showed that COS produced by chitosanase were better compared to lysozyme. These different methodologies to produce COS, could produce fractions with different acetylation rate versus deacetylation (A / D).

It has been reported that chitosan with higher molecular weights could present strong intermolecular interactions from their hydrogens, which would reduce the ability of the amine and hydroxyl groups to react with different radicals. In the case of COS, which have lower molecular weights, this intramolecular force would be lower compared to the high molecular weight CH, and therefore have a better activity in chelate ions. (FENG et al., 2008; SAYAS-BARBERÁ et al., 2011; SUN et al., 2007; XING, LIU et al., 2005; YANG, SHU, SHAO, XU AND GU, 2006; YEN, YANG AND MAU, 2008; ZHONG et al., 2007).

The DNA nicking assay was performed to verify the ability of COS to protect supercoiled pBR322 DNA plasmid against oxidation. In this assay the antioxidant activity was measured by the degree of protection of DNA from devastating effects of hydroxyl radicals generated by Fenton's reagent. DNA damage is related to the conversion of the supercoiled form of this plasmid DNA to the open circular and further linear forms (JUNG AND SURH, 2001). Fig 4C shows the antioxidant and DNA protection abilities of COS. Due to exposure to Fenton's reagent, the supercoiled form decreased and converted into the open-circular and

linear forms. In Fig. 4A, the reaction took place without the presence of the Fenton's reagent, thus the intensity in the gel demonstrates the presence of supercoiled DNA. At concentrations of 400 μM and 200 μM COS does not appear to have provided protection to DNA damage. Already at a concentration of 100 μM , the intensity was reported that DNA protection by the presence of intensity in the gel demonstrates the presence of super-coiled DNA. Hydroxyl radicals are highly reactive and have been highly damaging to health, being able to damage almost all cellular molecules. This radical has the ability to join nucleotides in DNA strand breaks causing it to contribute to carcinogenesis, mutagenesis and cytotoxicity (Hochstein and Atallah, 1988; Babu et al., 2001). As there is no specific enzyme or antioxidant system for protection against these free radicals in the body, the discovery of products with antioxidant properties have been increasingly important.

The antioxidant properties of oligosaccharides have attracted attention, mainly due to its ability to donate protons because the free radical can react with the NH_2 group forming the NH_3^+ group as a result of absorption of the solution hydrogen ion. In these groups, the hydroxyl carbons 2, 3 and 6 of the pyranose ring may react with unstable free radicals to form stabilized molecule (KIM & RAJAPAKSE, 2005).

3.4 Antitumor activity in vitro/Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of COS is shown in Table 4 with their percentage inhibition. COS were tested at a concentration of 25 μM in NCI-H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma), HEP-2 (human laryngeal carcinoma) and HT-29 (human colon cancer) cell cultures. Results showed that COS were able to inhibit the growth lineages of NCI-H292 in 29.8% HEP-2 in 20.1% and HT-29 27.1%. The COS showed no inhibition percentage for the cell line MCF-7.

The doxorubicin compound, a drug widely used in chemotherapy for cancer, was used as a positive control showing in a concentration of 25 μ M inhibitions of 94.15% for NCI-H292, 79.39% for HEP-2, 64.1 % for HT-29 and 74.7% for MCF-7.

The effects of COS on viability of rabbit aortic endothelial cells (RAEC) are shown in tale 4 which presented low or negligible inhibition of viability, even in higher concentration at 200 μ M. This data suggest that chitosan and derivates are not toxic to RAEC.

According to the methodology here applied, antiproliferative substances exhibit inhibition values above 75% this *cut-off* qualifies substance to be included in screening compounds having antitumor activity according to the protocol of the National Cancer Institute (NCI). According to this protocol compounds with antiproliferative action between 20 and 50% have little antitumor activity *in vitro*, what was observed in compounds tested, showing no cytotoxicity in this *in vitro* methodology.

De Assis (2012) examined the cytotoxic effect COS produced from commercial chitosan on some cell lines cells such as the fibroblast 3T3, hepatocarcinome HepG2 cells and HeLa cervical adenocarcinome cells. The HepG2 cells in this study, when treated with COS at the concentration of 0.2 mg/ml, cell viability was of 20% and at higher concentrations, it remained practically unaltered. These results corroborate literature data, in which chitooligosaccharides did not show any activity against Hep₃B cells.

In this same study, however, COS decreased cell viability was dose dependent against HeLa cells. Cell viability decreased by 60% at a concentration of 0.5 mg/mL. Similar results were found by Jeon and Kim (2002), where chitooligosaccharides inhibited uterine tumors in rats by 73.6%. Kim and Rajapakse (2005) observed that a mixture of chitosan oligomers from tetramer to pentamer could inhibit tumor cell growth in rats. It was observed that HeLa cells were more sensitive than the other ones showing that biological functions of

chitoooligosaccharides depend not only on the degree of polymerization, but also on its molecular weight (KIM AND RAJAPAKSE, 2005; SHEN et al., 2009).

This leads to the hypothesis that COS have antitumor activity related to mechanisms that cannot be assessed by *in vitro* assays such as angiogenesis inhibition, a mechanism of fundamental importance for tumor growth, on the tumor microenvironment, or on the epithelium-mesenchymal transition, a process in which epithelial cells undergo change in its polarization and consequently morphological and biochemical changes, making it migratory and invasive capacity, and resistance to apoptosis (ONUCHIC, 2010; HEINTEL, 2013)

3.5 Assessment of acute toxicity

The toxicity evaluation is performed in order to determine the potential of new substances and products harmful to human health. Tests assessing acute systemic toxicity are used to classify and appropriately label substances according to their potential lethality or toxicity as laid down by legislation (COECKE et al., 2005).

In this study, none of the doses tested (500, 1000, 2000 mg/Kg) showed toxicity in the animals, there was no death thereof. It was not identified behavioral changes such as in motor behavior, gait, breathing, piloerection or contortions.

Similar results were found by Fernandes et al., (2010), which examined the acute toxicity of a mixture of COS with distinct average molecular weights—1.2 and 5.3 kDa and possessing a degree of deacetylation in the 80–85% range. In this study, treatment was administered between 50 and 1000 mg / kg, and no significant change in behavior was observed.

3.6 Analgesic Activity

In Fig 5 is represented the number of abdominal writhing in mice by administration of test compounds and acetic acid. Animals that were treated with saline, showed an average of 35 writhings; SSA (aspirin) 6.2; COS (100 mg/kg) 5.2; COS (200 mg / kg) 0.6 and COS 400

mg/Kg showed no abdominal writhing. Thus it is suggested that the COS have analgesic activity, proportional to its concentration.

Concern for the clinical use of new substances with analgesic activity, mainly used for the treatment of various types of pain (both neurogenic or inflammatory origin) is increasing significantly. Various nociception models in laboratory animals were developed to verify the analgesic activity compounds. The test of abdominal writhing induced by acetic acid in mice is widely used as a screening analgesic substances (COLHIER et al; 1968). The reaction of pain to exogenous compounds results in the release of various endogenous substances, called algogenic that activate nociceptors involved in this process (FALEIROS et al; 1997) This test can be considered a preclinical test importance to evaluate the antinociceptive effect because it allows a correlation between the appropriate value of the effective dose in animals obtained, and doses analgesic in human (COLLIER et al., 1968).

Okamoto et al.(2002) claim that chitosan also has topical analgesic effect resulting from the capture of acidic hydrogens released at the site of inflammation by ionization of the amine group (NH_2) to form NH_3^+ . As chitosan, the COS possible exert its analgesic effect through absorption of proton ions released in the inflammatory site

3.7 Antitumor activity in vivo

Fig 6 shows the inhibition of Ehrlich carcinoma and sarcoma 180 tumor from the treatment of COS (400 mg/kg/day) and 5-FU drug. The dose chosen for this analysis was 400 mg/kg/day because it was from that concentration was total inhibition of pain as reported previously.

COS presented themselves as potential inhibitors of Ehrlich carcinoma and sarcoma 180, promoting regression of the tumor mass. With the administration of COS, tumor weights that were 2.38 g and 1.8 g (saline control) became 0.9 and 0.66 for Ehrlich carcinoma and sarcoma 180, respectively while 5-FU decreases tumor weight to 0.6 for both tumor types.

(Fig 7 and 8) From this data it was calculated the percentage of inhibition that the studied compounds provided. For Ehrlich carcinoma tumors COS inhibited 61.8% while the 5 FU 76.6%. For sarcoma 180, COS inhibited 63.1%, whereas 5-FU inhibited 76.8% of the growth of tumor in mice (Fig 6).

Cancer is a group of diseases characterized by the development of tissue mass resulting in an enhanced cell division. In developing these diseases, the growth of tumor tissue exceeds the number of healthy tissue cells (KIRCHNER, 2014). The growing number of new cancer cases has driven research aimed at finding alternative treatment for this group of diseases (HURYIN, 2013; REITZ, 2013).

Biological activity of chitosan oligosaccharides to inhibit growth of tumors has been described in the literature. This activity is dependent on the structural feature of these compounds, as the degree of deacetylation and the molecular weight of the oligomers.

Quin et al (2002) studied the *in vivo* antitumor activity of COS with molecular weight between 3-10 kDa, and degree of polymerization of 80%, it has shown that these compounds at a dosage of 200 mg / kg, inhibited 56.9% the Sarcoma 180 tumor growth. Suzuki et al (1986), demonstrated tumor inhibition in 93% of COS with a molecular weight around 1 kDa and degree of polymerization of 100%.

Studies suggest that the antitumor activity of COS act not only killing tumor cells, but also from their immunological effects by increasing the lymphocyte production, generating an antitumor response of cytotoxic T-lymphocytes. (TOKORO, TATEWAKI, SUZUKI, MIKAMI, SUZUKI AND SUZUKI, 1998).

Oligosaccharides also induce apoptosis, according to Xu et al. (2008), observed when treating cells hepatocarcinoma (SMMC-7721) with oligosaccharides. The possible mechanism is that the COS regulate the expression of pro-apoptotic protein BA and caspase activation (serine proteases), triggering the cell apoptosis program. It was also described that

the COS manifested an inhibitory effect of growth and anti-metastatic on lung carcinoma in mice with intramuscular administration (TSUKADA et al., 1990).

4. Conclusions

This work reported the production of chitosan oligosaccharides from marine shrimp *Litopenaeus vannamei* processing waste. The products were obtained by non-specific enzymatic hydrolysis using pepsin. The COS produced exhibited moderate antioxidant activity, showed no toxicity, analgesic activity and interesting ability to tumor inhibition *in vivo*. Thus, the production of COS, besides being obtained from low added value raw-material, they can be considered potential biomolecules with extensive application in medical field, pharmaceutical or food industries.

Acknowledgments

The authors acknowledge the support given by the CNPq, Laboratory of Enzymology (LABENZ), Department of Biochemistry and Fundamental Chemistry the University Federal of Pernambuco (UFPE), and Northeast Strategic Technologies Center (CETENE).

References

ARRUDA, L. F. Aproveitamento do resíduo do beneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para obtenção de silagem e óleo como subprodutos. 78 f. **Dissertação (Mestrado)** - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BABU, B.H., SHYLESH, B.S., PADIKKALA, J.,. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Alanthus icicifocus*. **Fitoterapia** 72, 272–277, 2001.

CABRERA, J. C.; CUSTEM, P.V. Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acido or enzymatic degradation chitosan. **Biochemical Engineering Journal**, 25, 165-172, 2005.

CHEN, A.S., TAGUCHI, T., SAKAI, K., KIKUCHI, K., WANG, M.W., MIWA, I.,. Antioxidant activities of chitobiose and chitotriose. **Biol. Pharm. Bull.** 26, 1326–1330, 2003.

CHEN, X.; XIA, W.; YU, X. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus sp.* CJ22-326. **Food Research International**, 38, 315-322, 2005.

CIRA, L.A., HUERTA, S., HALL, G.M.; SHIRAI, K. Pilot scale latic acid fermentaios of shrimp waste for chitin recovery. **Process in Biochemistry**, v.37, p.13-59, 2002.

COECKE, S., BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-

HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals. suppl** 1, p. 147-175, 2005.

COLBURN, P.; BUONASSISI, V. Anti-clotting activity of endothelial cell cultures and heparan sulfate proteoglycans. **Biochem Biophys Res Commun.** 1982 Jan 15;104(1):220–227

COLLIER, H. D. J.; DINNEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. Abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. The Pharmacol.**, 32, 295. 1968.

DI ZHAOA, JIANGTAO W.,*, LIJU TANA, CUIYU SUNB, JUNNI DONGC. Synthesis of N-furoyl chitosan and chito-oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity in vitro. **International Journal of Biological Macromolecules** 59 391– 395, 2013.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture.** FAO, Roma (disponível em www.fao.org), 2014

FALEIROS, R. R. ; ALVES, G. E. S. ; MARQUES JR, A. P. . Dor aguda:vias anatômicas, bioquímica e fisiopatologia. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária (UFMG)** ,v. 21, p. 5-14, 1997

FENG, T., DU, Y., LI, J., & KENNEDY, JF. Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. **Carbohydr Polym.** 73, 126-132, 2008.

FERNANDES JOÃO C, HUMBERTO SPINDOLA, VANESSA DE SOUSA , ALICE SANTOS-SILVA, MANUELA E. PINTADO, FRANCISCO XAVIER MALCATA AND

JOÃO E. CARVALHO Anti-Inflammatory Activity of Chitooligosaccharides in Vivo. **Mar. Drugs**, 8, 1763-1768, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.480, p.239-47,2000.

HARISH PRASHANTH, K.V., THARANATHAN, R.N.,. Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. **Biochim. Biophys. Acta** 1722, 22–29, 2005.

HOCHESTEIN, P., ATALLAH, A.S. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. **Mutat. Res.** 202, 363–375. 1988.

HUANG, R., MENDIS, E., RAJAPAKSE, N., KIM, S.K. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS). **Life Sci.** 78, 2399–2408, 2006.

HUANG, J., ZHAO, D., HU, S., MAO, J., & MEI, L. Biochemical activities of low molecular weight chitosans derived from squid pens. **Carbohydrate Polymers**, 87(3), 2231–2236. 2012.

HURYN, D. M. Drug Discovery in a academic setting: Playing to strengths. **ACS Med. Chem. Lett.** V. 4, p 313-315, 2013.

JE, J.Y., PARK, P.J., KIM, S.K.,. Free radical scavenging properties of heterochitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. **Food Chem. Toxicol.** 42, 381–387, 2004.

JUNG, Y., SURH, Y.,. Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copperstimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1407–1417. 2001

KIRCHNER, T., MÜLLER S, HATTORI T, MUKAISYO K, PAPADOPOULOS T, BRABLETZ T, JUNG A. Metaplasia, intraepithelial neoplasia and early câncer of the stomach are related to dedifferentiated epithelial cells defined by cytokeratin-7 expression in gastritis. *Virchows Archiv*, v. 439, n. 4, p. 512-522, 2014.

KIM SK, RAJAPAKSE N. Enzymatic production na biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): **A review.**;62: 357-368. 2005.

KOGAN, G., SKORIK, Y.A., ZITNANOVA, I., KRIZKOVA, L., DURACKOVA, Z., GOMES, C.A., YATLUK, Y.G., KRAJCOVIC, J.,. Antioxidant and antimutagenic activity of N-(2- carboxyethyl)chitosan. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201, 303–310. 2004.

LI, K., XING, R., LIUA, S., LI, R., QINA, Y.,. MENGA, X.,. LI, P. Separation of chito-oligomers with several degrees of polymerization and study of their antioxidant activity . *Carbohydrate Polymers* v. 88 896– 903, 2012.

LIU, C. G., CHEN, X. G. AND PARK, H. J., Selfassembled nanoparticles based on linoleic-acid modified chitosan: stability and adsorption of trypsin. *Carbohydr. Polym.*, 62, 293-298, 2005.

MAGALHÃES, L. M. SEGUNDO., M. A, REIS S, LIMA., J. L. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, v. 613, n. 1, p. 1-19, 2008.

MARTONE, C.B.; BORLA, O.P.; SÁNCHEZ, J.J. Fishery byproduct media as a nutriente source for bacteria and archaea growth. **Bioresource Technology**, v. 96, p.383-387, 2005.

MENGÍBARA M, MATEOS-APARICIOB, I., MIRALLESC, B., HERASA Á, Influence of the physico-chemical characteristics of chito-oligosaccharides (COS) on antioxidant activity **Carbohydrate Polymers** 97 776– 782, 2013

MING, M.; KUROIWA, T.; ICHIKAWA, S.; SATO, S.; MUKATAKA, S. Production of chitosan oligosaccharides by chitosanase directly immobilized on an agar gel-coated multidisk impeller. **Biochemical Engineering Journal**, 28, 289-294, 2006.

NUNTHANID, J., UNTHANID, J., PUTTIPIPATKHACHORN, S., YAMAMOTO, K., PECK, G.E, Physical properties and molecular behavior of chitosan films. **Drug develoment and industrial pharmacy**, 27, 143-157, 2001.

OKAMOTO, Y. KAWAKAMI, K., MIYATAKE, K., MORIMOTO, M., SHIGEMASA, Y., & MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, 49(3), 249-252. 2002.

PANTALEONE, D.; YALPANI, M.; SCOLLAR, M. Unusual susceptibility of chitosan to enzymic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, 237, 325–332, 1992.

PARK, P.J., JE, J.Y., KIM, S.K., Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** 51, 4624–4627, 2003.

QIN, C., DU, Y., XIAO, L., LI, Z., GAO, X.,. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. **Int. J. Biol. Macromol.** 31, 111–117. 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical **Biology and Medicine**, v. 26, p.1231– 1237, 1999.

REITZ, A. B. Future horizons in drug Discovery research. **ACS Med. Chem. Lett.** V.3, p. 80-82, 2013.

ROCHA, I.P., RODRIGUES, J., AMORIM, L. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 30, 2004

RONCAL, T.; OVIEDO, A.; ARMENTIA, I. L.; FERNANDEZ, L.; VILLARÁN, M. C. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis os a high deacetylation degree chitosan. **Carbohydrate Research**, 342, 2750-2756, 2007.

SAYAS-BARBERA B, QUESADA J, SÁNCHEZ-ZAPATA E. Effect of the molecular weight and concentration, of chitosan in pork model burgers. **Meat Sci** 88: 740-749. 2011.

SHAHIDI, F., ABUZAYTOUN, R.,. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. **Adv. Food Nutr. Res.** 49, 93– 135. 2005.

SHIGEMAZA, Y.; MATSURA, H.; SASHIVA, H.; SAIMOTO, H. An improved IR spectroscopic determination of degree of deacetylation of hitin, in **Advances in Chitin Science**, Vol I, ed by Domard A, Jeuniau C, Muzzarelli RAA and Roberts G, Jacques Andre´ Publishers, Lyon, France.; p. 204–209, 1996.

SUN T., ZHOU, D., MAO, F.& ZU, Y. Preparation of low molecular weight carboxymethyl chitosan and their superoxide anion scavenging activity. **Eur. Polym. J.**, 3, 652-656, 2007.

TOMIDA, H., FUJII, T., FURUTANI, N., MICHIHARA, A., YASUFUKU, T., AKASAKI, K. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. **Carbohydrate Research**, 344(13), 1690–1696, 2009.

TOKORO, A., TATEWAKI, N., SUZUKI, K., MIKAMI, T., SUZUKI, S., & SUZUKI, M. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against meth-A solid tumor. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 36, 784 e 790. 1988.

TSUKADA, K.; MATSUMOTO, T.; AIZAWA, K.; TOKORO, A.; NARUSE, R.;SUZUKI, S.; SUZUKI, M. Antimetastatic and growth-inhibitory effects of Nacetylchitohexaose in mice bearing lewis lung carcinoma. **Japanese Journal of Cancer Research**, 81, 259 -265, 1990.

VALKO M., D. LEIBFRITZ, J. MONCOLA, M.T.D. CRONIN, M. MAZURA, AND J. TELSER. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol** 39:44–84, 2007

YANG, T.C., CHOU, C.C., LI, C.F.,. Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. **Int. J. Food Microbiol.** 97, 237–245, 2005.

YANG, Y., SHU, R., SHAO, J., XU, G., & GU, X. Radical scavenging activity of chitooligosaccharide with different molecular weights. **European Food Research and Technology**, 222(1), 36–40., 2006.

YEN, M., YANG, J., & MAU, J.. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, 74(4), 840–844, 2008.

XIE, W.M., P.X. XU, Q. LIU, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 11 1699–1701, 2001.

XU, Q.; DOU, J.; WEI, P.; TAN, C.; YUN, X.; WU, Y.; BAI, M. A, X.; DU, Y. Chitooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via upregulation of Bax. **Carbohydrates Polymers**, 71, 509-514, 2008.

ZHONG, Z., JI, X., XING, R., LIU, S., GUO, Z., CHEN, X. The preparation and antioxidant activity of the sulfanilamide derivatives of chitosan and chitosan sulfates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 15(11), 3775–3782. 2007.

Figures:

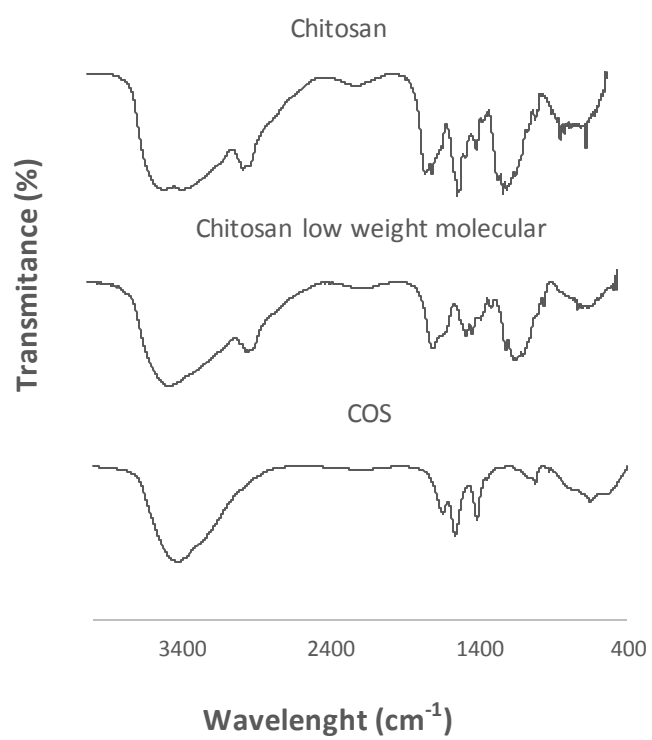


Fig 1. FT-IR spectrums of Chitosan and products from no-speicific enzymatic hydrolysis

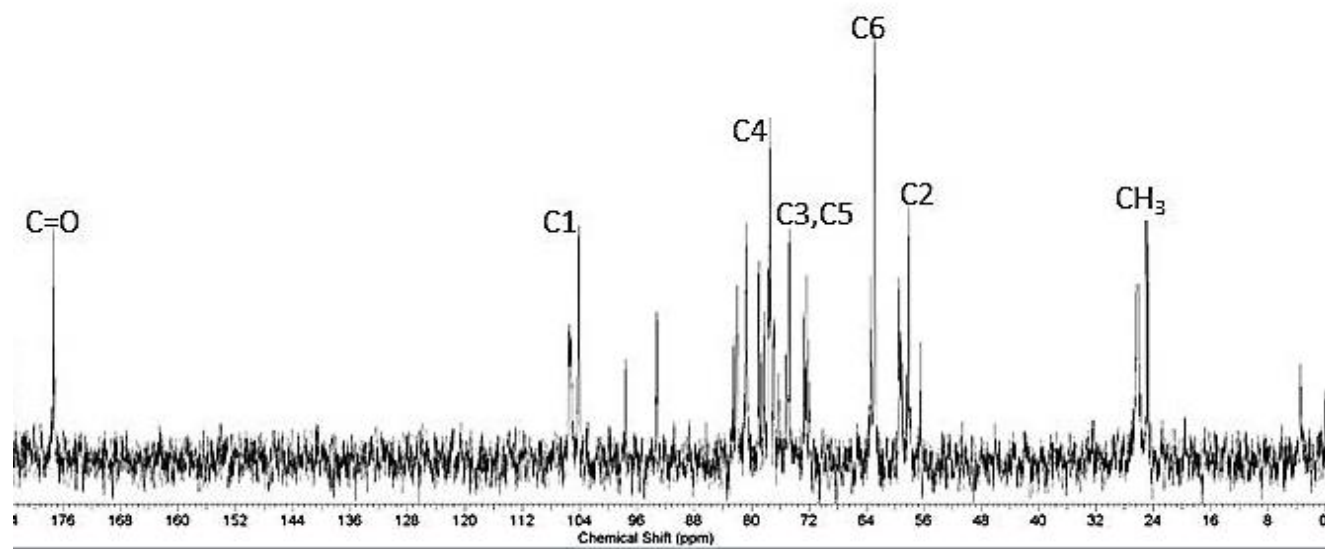


Fig 2 ^{13}C NMR spectra of COS.

A

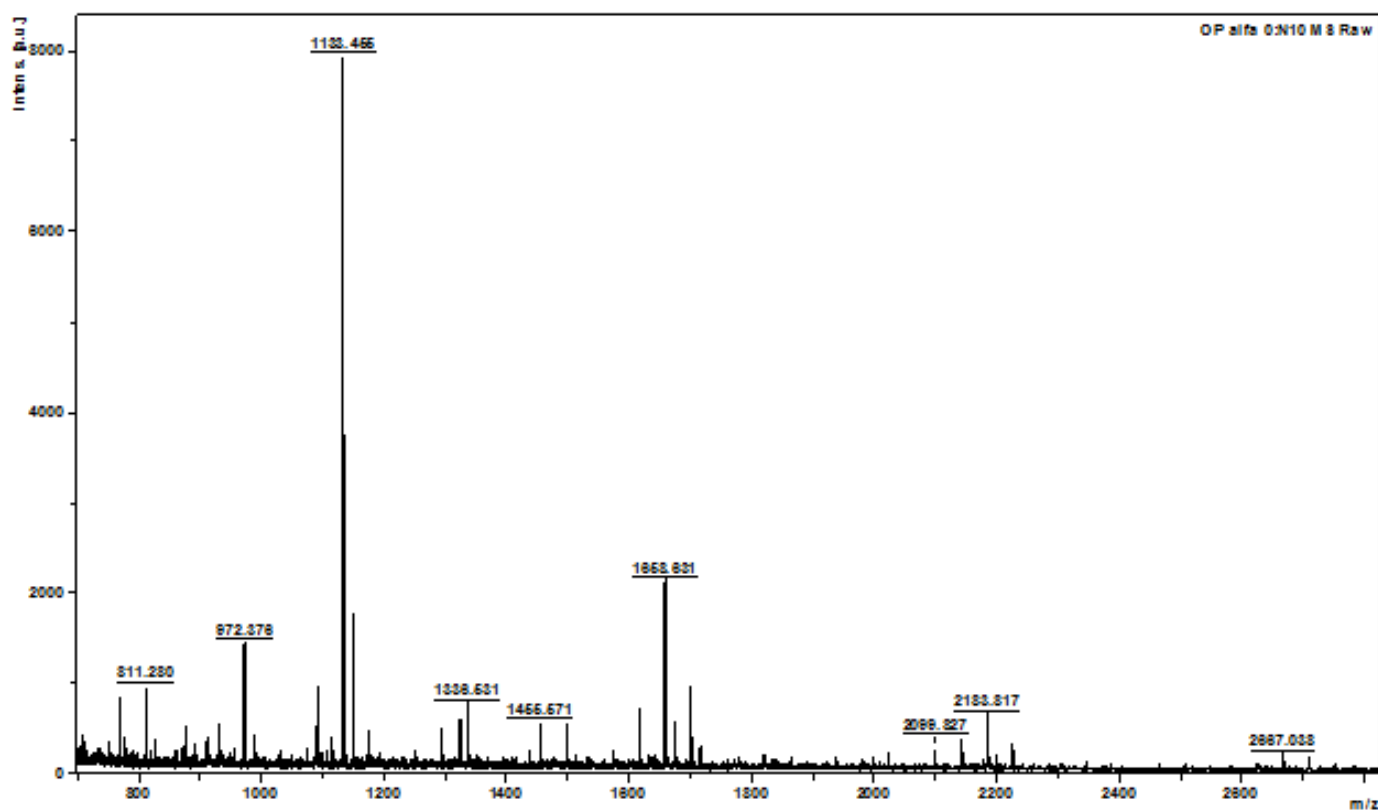
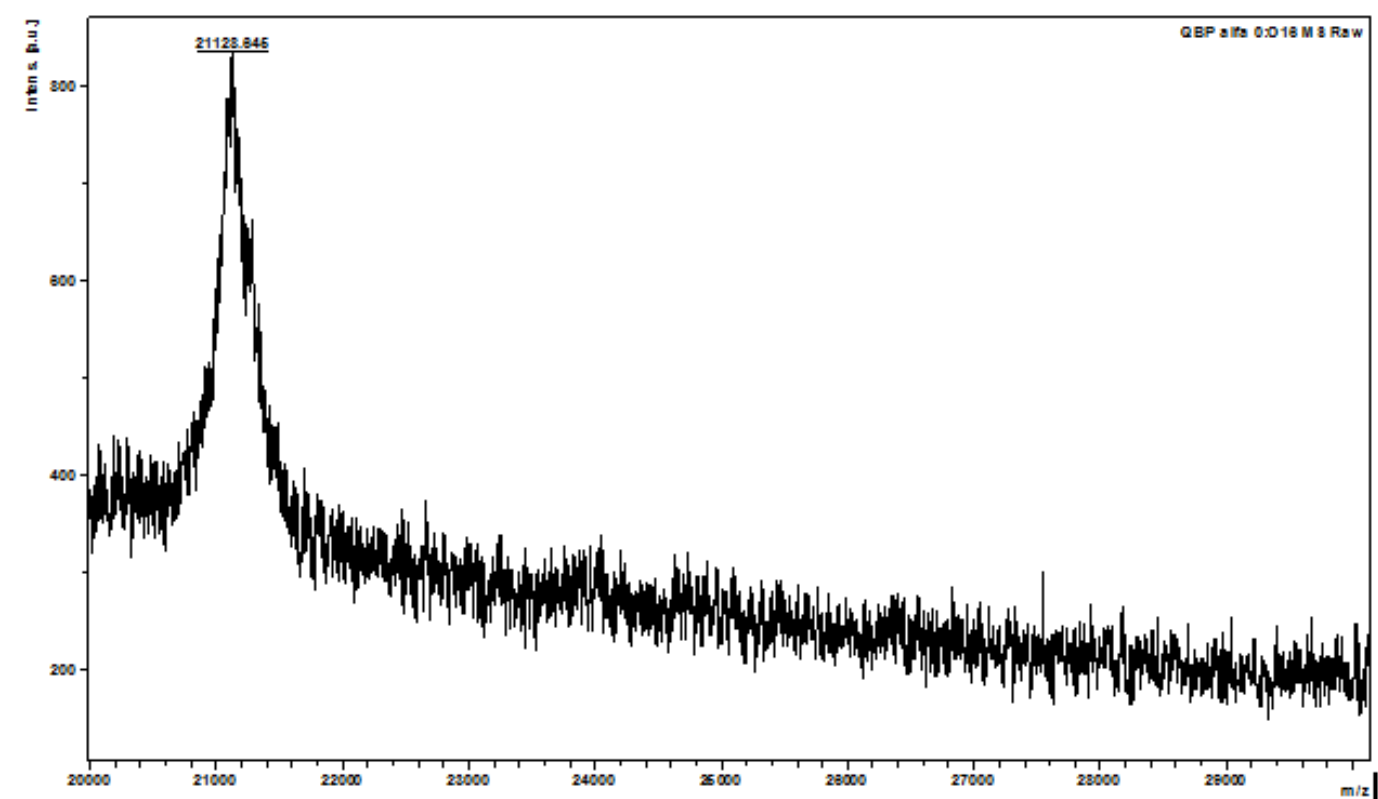


Fig. 3 MALDI-TOFMS spectra of Chitosan low weight molecular (A) and Chitoligosaccharides (B).

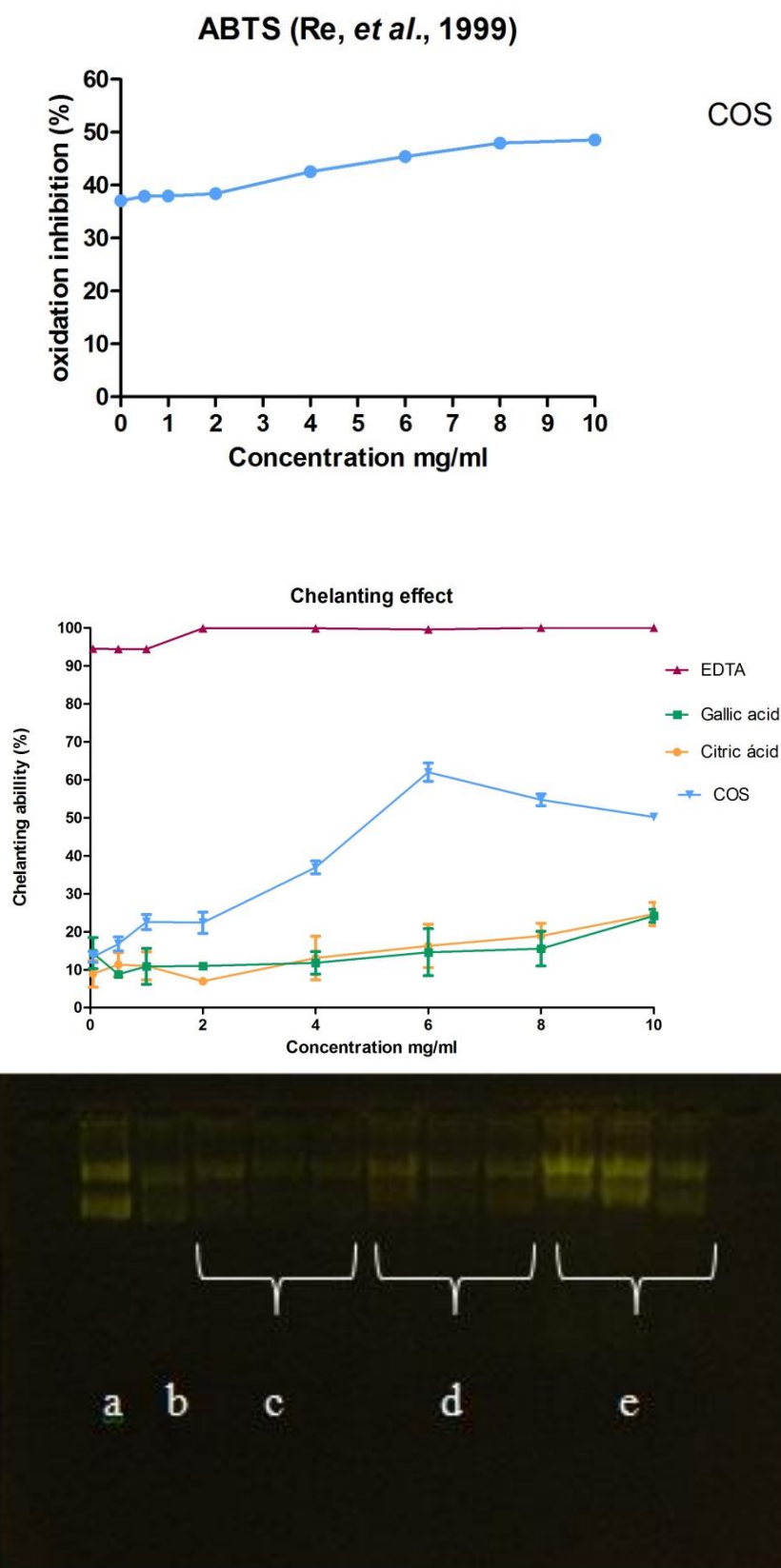


Fig. 4 Potential antioxidant of COS (A) ABTS, (B) Chelating effect, (C) Protective effects of COS in DNA nicking assay. (a) negative control (distilled water + DNA), (b) control (DNA + Fenton's reagent), (c) COS 400 µg/mL + Fenton's reagent, (d) COS 200 µg/mL + Fenton's reagent, (e) COS 100 µg/mL + Fenton's reagent.

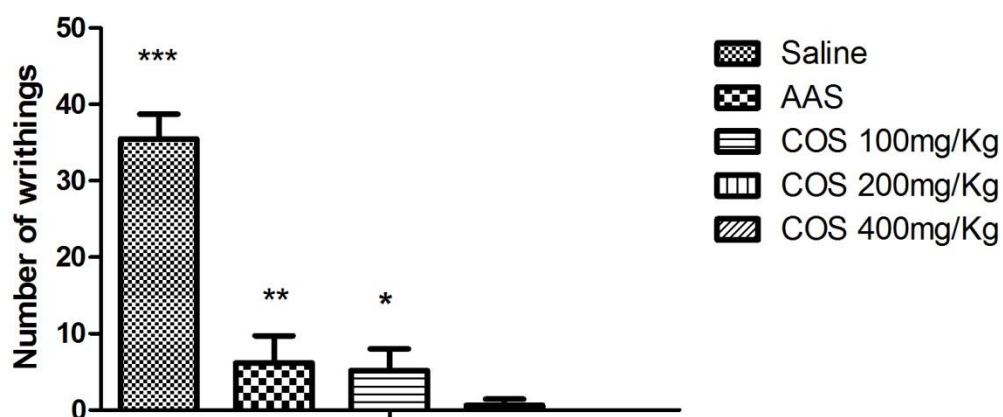


Fig 5.Analgesic Activity: Abdominal constriction response caused by intraperitoneal injection of diluted acetic acid. Animals that were treated with saline; AAS (aspirin); COS (100 mg/kg); COS (200 mg/kg) and COS to 400 mg/Kg. Statistical differences were determined by one-way ANOVA followed by Tukey test ($P < 0.05$)

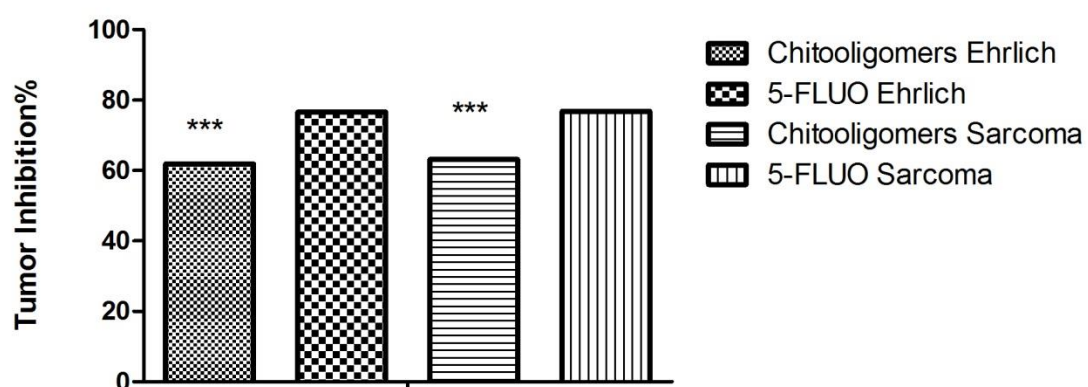


Fig 6. Inhibition of tumor Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 from the treatment of COS (400 mg/kg) and 5-FU drug. The data represent the mean the standard deviation $\pm$ statistical differences were determined by one-way ANOVA followed by Tukey test.

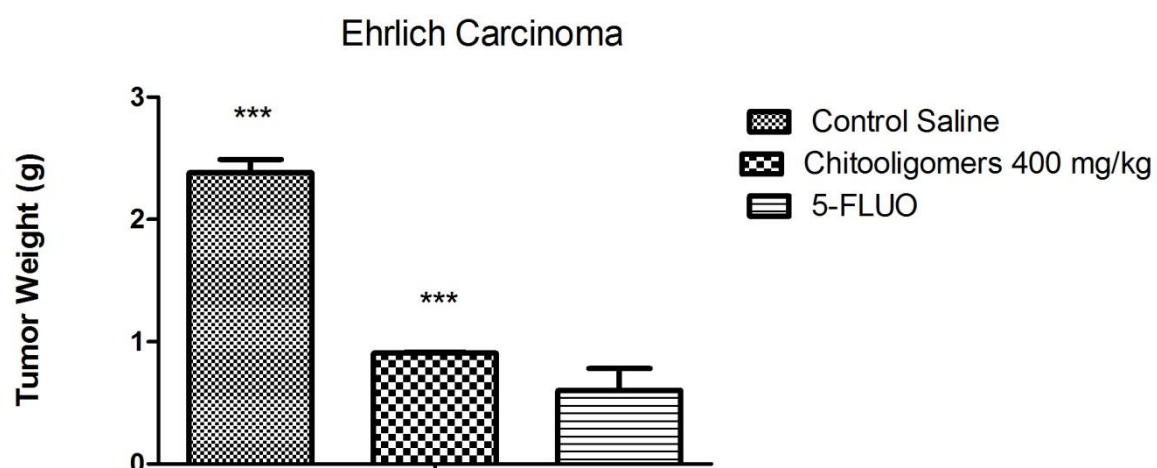


Fig 7. Weight of solid tumors Ehrlich carcinoma of the groups treated with saline, COS (400 mg / kg) and 5-FU. The data represent the mean standard deviation. The control of the statistical differences were determined by one way ANOVA followed by Tukey's test.

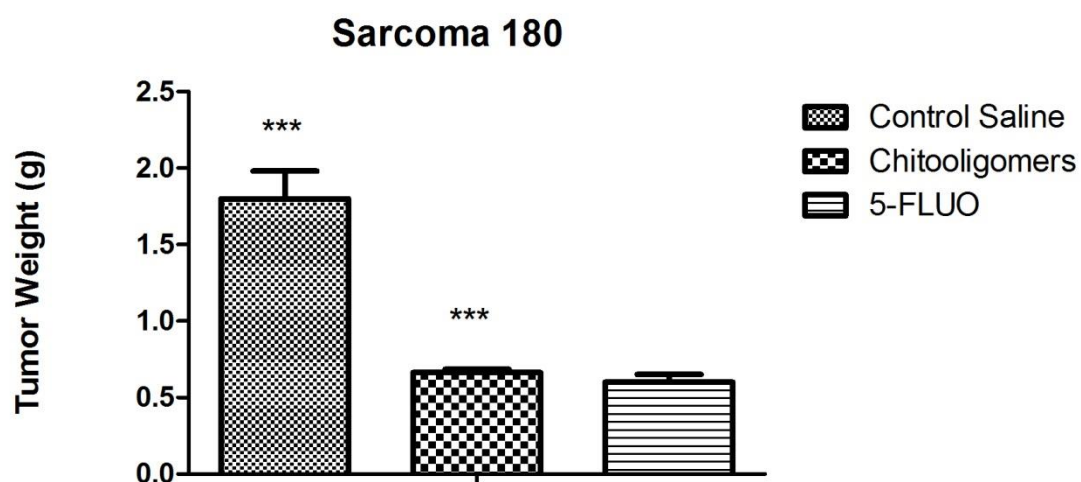


Fig 8. Weight of solid tumors Sarcoma 180 of the groups treated with saline, COS (400 mg / kg) and 5-FU. The data represent the mean standard deviation. The control of the statistical differences were determined by one way ANOVA followed by Tukey's test.

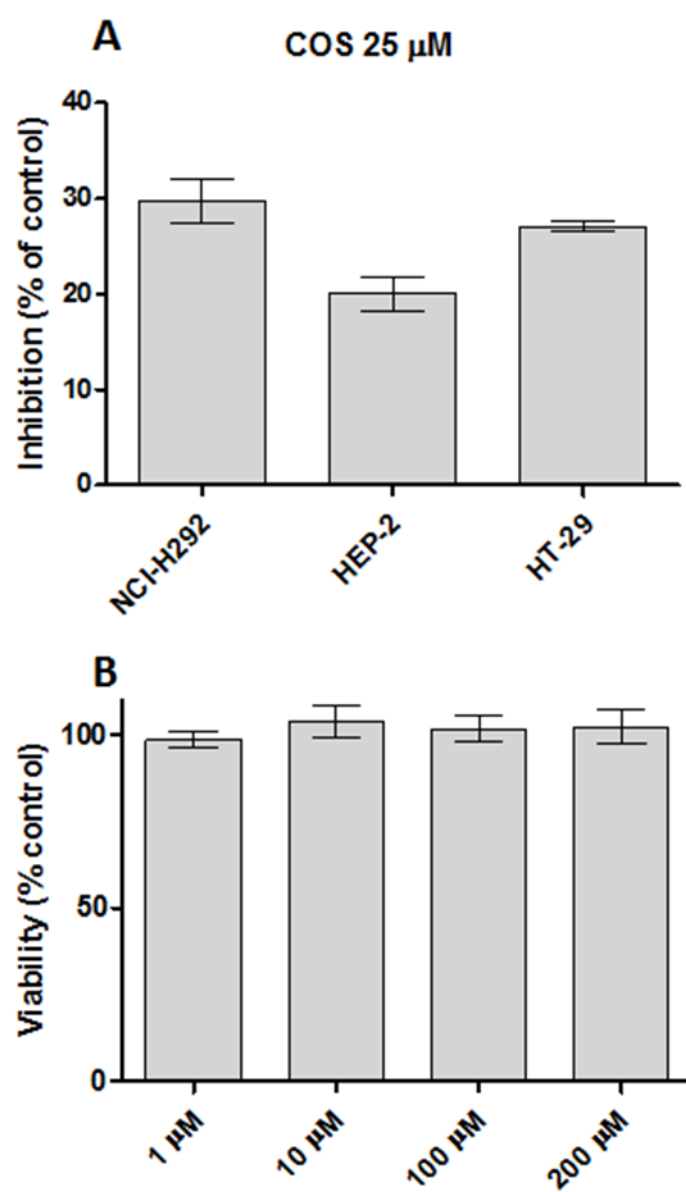


Fig 9. A: The inhibition effect of COS in human tumor cell lines (NCI-H292, HEP-2, HT-29,) concentration of 25 μ g/mL; **B:** Effect o COS concentrations to RAEC cells.

Tables

Table 1. Average molecular weight (Mw) by MALDI-TOF MS and desacetylation degree (DD) values (%) for chitosan (CH), low molecular weight chitosan (LWMCH) and chitoligosaccharides (COS) by FT-IR.

Samples	DD (%)	Mw (KDa)
CH	88.02	-
LWMCH	80.68	21
COS	81.58	0.811-2.667

Table 2. Prediction of the molecular weight of chitosan oligosaccharides (CTS-OS) by MALDI-TOF MS analysis.

<i>Chitosan oligosaccharides (COS)</i>	<i>DP</i>	<i>m/z</i>
GlcN	1	161
GlcNAc	1	203
(GlcN) ₅	5	811
(GlcN) ₆	6	972
(GlcN) ₇	7	1133
(GlcN) ₅ + GlcNAc + (GlcN) ₂ Or (GlcN) ₇ + GlcNAc	8	1336
(GlcN) ₉	9	1455
(GlcN) ₅ + GlcNAc + (GlcN) ₃ Or (GlcN) ₉ + (GlcNAc) ₁	10	1658
(GlcN) ₁₃ ; (GlcN) ₁₁ + (GlcNAc) ₂	13	2099; 2183
(GlcN) ₁₄ + (GlcNAc) ₂	16	2667.038

Table 3 Antioxidant activity (ABTS+) of COS Mean $\pm$ SD, n = 3. ^aTEAC = antioxidant activity equivalent to Trolox. Each value is expressed as mean $\pm$ SD (n = 3).

<i>Concentration of COS (mM)</i>	<i>% Inhibition</i>	<i>TEAC ^a (μM Trolox)</i>
0.005	37.06	1010.00-
0.5	37.98	1027.50
1	37.94	1026.67
4	42.57	1115.00
6	45.41	1169.17
8	47.95	1217.50
10	48.56	1229.17

Table 4. A: The inhibition effect of COS in human tumor cell lines (NCI-H292, HEP-2, HT-29,) concentration of 25 µg/mL; B: Effect o COS concentrations to RAEC cells.

Test products	% Inhibition							
	NCI-H292	DP	HEP-2	DP	HT-29	DP	MCF-7	DP
COS	29.8	2.3	20.1	1.8	27.1	0.6	0.0	0.0
Doxorubicin	94.15	1.99	79.39	2.65	64.1	1.1	74.7	2.1

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A partir da quitosana obtida de resíduos do processamento do camarão *Litopenaeus vannamei*, os oligossacarídeos foram produzidos com sucesso por hidrólise enzimática não específica utilizando pepsina;
- Os oligossacarídeos, bem como a quitosana de baixo peso molecular foram caracterizados quimicamente apresentando perfil semelhante ao da quitosana; estes apresentaram baixo peso molecular;
- Quando avaliados frente a modelos de radicais livres, mostraram capacidade em sequestrar radicais instáveis, quelar íons e proteger o DNA contra danos oxidativos;
- Na avaliação da citotoxicidade, demonstraram ter atividade inibitória contra células tumorais e baixa toxicidade frente a células normais;
- Não apresentaram toxicidade em modelos experimentais in vivo e demonstraram sua capacidade analgésica;
- Quando avaliada sua atividade antitumoral in vivo, estes demonstraram interessante capacidade em inibir o crescimento tumoral;
- Além de suas interessantes propriedades, a obtenção destes produtos a partir de resíduos da indústria pesqueira, faz com que sua produção tenha melhor relação custo/ benefício, quando comparados a outros polímeros atualmente utilizados no mercado se configurando como potenciais produtos para serem aplicados nas indústrias biomédicas, farmacêutica e alimentícia, sendo necessário futuros estudos.