



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARLLEN SANTOS DA SILVA

**PROSPECÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA EM RESÍDUOS DE
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

São Luís-MA

2018

MARLEN SANTOS DA SILVA

**PROSPECÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA EM RESÍDUOS DE
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Talita da Silva Espósito.

São Luís-MA

2018

Santos da Silva, Marllen.

PROSPECÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA EM RESÍDUOS DE
TILÁPIA *Oreochromis niloticus* / Marllen Santos da Silva. -
2018.

40 f.

Orientador(a): Talita da Silva Espósito.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Biotecnologia. 2. Maranhão. 3. Processamento. 4.
Tilapicultura. I. da Silva Espósito, Talita. II. Título.

MARLLEN SANTOS DA SILVA

**PROSPECÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA EM RESÍDUOS DE
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Talita da Silva Espósito (Orientadora)
Departamento de Oceanografia e Limnologia - UFMA

Prof^o. Dr^a. Mayara Ingrid Sousa Lima
Departamento de Biologia - UFMA

Prof^o. Dr^a. Sally C. M. Monteiro
Departamento de Farmácia - UFMA

Aos meus pais: Maria do Rosário e Astrogilmar;

Aos meus irmãos: Vânia, Amaury e Maurício.

AGRADECIMENTOS

A quem agradecer primeiro quando há tantos envolvidos? Começarei por agradecer à Deus, foi Ele quem me deu forças para perseguir meu objetivo e me fez perseverar nos momentos mais difíceis.

Em segundo agradecerei à minha mãe por ter sempre me incentivado a ir atrás dos meus sonhos e estar presente em todos os meus passos, desde o primeiro deles. Obrigada mãe, você é a melhor mãe que alguém poderia pedir para ter.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional, por me aguentar quando estava estressada e desculpa pelos gritos, sei que foi difícil para vocês.

À professora Dra. Talita Espósito, obrigada pela orientação durante essa caminhada. Obrigada por me apresentar a esse mundo tão vasto e bonito que é a Biotecnologia Enzimática, sinto que aqui encontrei a minha verdadeira paixão. Obrigada pelos incentivos para que eu sempre melhorasse e me tornasse a melhor versão de mim mesma. Obrigada pela paciência, dedicação e auxílio nos experimentos.

Ao meu amigo Allysson Carvalho, obrigada por estar sempre aqui comigo. Obrigada por me acalmar e dizer que iria dar tudo certo, por me ouvir, aguentar meus surtos e afugentar meus medos e anseios. Que nossa parceria continue dentro e fora do laboratório e que a nossa amizade seja eterna.

À minha amiga Lídia Travassos que está comigo desde o início, obrigada pelos “acorda e vai estudar”, “você vai conseguir”, “você é capaz”, saiba que você tornou tudo mais lindo e divertido.

À todos os meus amigos, obrigada por me ouvirem principalmente durante esses últimos meses, vocês tornaram tudo mais fácil e ao Raphael pelos momentos maravilhosos. E a todos que entraram na minha vida recentemente e só conhecem a minha versão preocupada, obrigada por me aturarem não sou sempre assim, prometo.

Obrigada!

RESUMO

A aquicultura vem crescendo expressivamente no Brasil com o foco na tilapicultura, principalmente no Nordeste. O aumento da criação de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), deve-se essencialmente às características relativas à carne proporcionando uma boa aceitação do filé pelo mercado consumidor aliado à facilidade de cultivo. Definidos como sobra de processamento de alimentos, os resíduos de pescado somam cerca de 50% da matéria prima inicial que não será aproveitada ao final do processamento. Aproximadamente 120 milhões t/ano de resíduos de pescado (ossos, pele, nadadeira, vísceras e cabeça) são descartados indevidamente no ambiente. Enzimas de interesse biotecnológico podem ser extraídos a partir dos resíduos de pescados, dando-os assim um destino economicamente viável. Fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima de interesse em diversos ramos da biotecnologia, sendo comumente usadas como ferramentas em biologia molecular e ensaios clínicos. Foram realizados cálculos de atividade enzimática específica e dosagem de proteínas em extratos brutos de diferentes órgãos de tilápia como forma de mensurar quais apresentavam maior viabilidade à extração de ALP. Por apresentarem maior atividade específica (U/mg), o fígado e o rim da tilápia são os órgãos com maior potencial para extração da ALP. Órgãos que são usualmente descartados, são fontes de biomoléculas de amplo interesse biotecnológico, apresentando-se como uma forma de agregar valor ao produto e diminuir a poluição ambiental.

Palavras chave: *Tilapicultura; Maranhão; Biotecnologia; Processamento.*

ABSTRACT

Aquaculture has been growing significantly in Brazil with the focus on tilapia farming, in certain regions, mainly in the Northeast, with emphasis in the Environmental Protection Areas in Maranhão. The increase in the production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is mainly due to the characteristics of the meat, providing a good acceptance of the fillet by the consumer market combined with the easeness of the cultivate. Defined as leftover from food processing, fish waste accounts for about 50% of the initial raw material that will not be use at the end of processing. Approximately 120 million tonnes/year of fish waste (bones, skin, fin, viscera and head) are improperly disposed in the environment. Enzymes of biotechnological interest can be extract from fish waste, thus giving them an economically viable destination. Alkaline Phosphatase (ALP) is an enzyme of interest in several branches of biotechnology, being commonly use as tools in molecular biology and clinical trials, in the field of marine food industry has its presence associated with the freshness level in fish muscles. Calculations of specific enzyme activity and protein dosage were perform in crude extracts from different tilapia organs as a means of measuring which were more viable to the extraction of ALP. Because of their higher specific activity (U / mg), the liver and tilapia kidney are the organs with the highest potential for extracting ALP. Organs that are usually discard are sources of biomolecules of broad biotechnological interest, presenting themselves as a way of adding value to the product and reducing environmental pollution.

Keywords: *Tilapiculture; Maranhão; Biotechnology; Processing.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade enzimática da ALP encontrada em EBT's de diferentes órgãos de <i>O. niloticus</i> (mg/mL).....	27
Tabela 2 - Dosagem de proteínas totais (mg/mL) encontrada em EBT's de diferentes órgãos de <i>O. niloticus</i>	28
Tabela 3 - Atividade enzimática específica de ALP encontrada em EBT's de diferentes órgãos de <i>O. niloticus</i> (mg/mL).....	28
Tabela 4 - Relação Hepatosomática – RHS (%) e Relação Nefrossomática - RNS (%) de EBT's dos fígado e rim extraídos de <i>O. niloticus</i>	29

.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ALP – Fosfatase Alcalina

EBT – Extrato Bruto de Tilápia

BSA – Albumina de Soro Bovino

HCl – cido clorídrico

Tris – *Tris*(hidroximetil)aminometano

RHS – Relação Hepatosomática

RNS – Relação Nefrossomática

ROC – Relação massa órgão/ massa Corporal

O. niloticus – *Oreochromis niloticus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Enzimas de uso biotecnológico	14
3.2 Resíduos de pescado	15
3.3 Tilapicultura no Brasil	16
3.4 Fosfatase Alcalina	17
REFERÊNCIAS	18
Artigo: PROSPECÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA EM RESÍDUOS DE TILÁPIA (<i>Oreochromis niloticus</i>)	21
5.ANEXO	33

1. INTRODUÇÃO

Fosfatases Alcalinas (ALPs) são um grupo de glicoproteínas ligantes de membrana capazes de hidrolisar uma ampla gama de monoésteres (CHIRAMBO et al., 2017). Como uma regra geral, ALPs são enzimas homodiméricas, onde cada monômero contém cinco resíduos de cisteína e três íons metálicos, dois Zn^{++} e um Mg^{++} que são essenciais para a atividade enzimática (LALLÉS, 2010). Possuem ampla distribuição em tecidos; sua função e modo de ação permanecem não totalmente compreendidos, sendo longamente dissuadidos em diversos mecanismos. (CHIRAMBO et al., 2017).

ALPs formam uma grande família de fosfono-desesterases não-específicos capazes de catalizar a hidrólise de compostos que contenham vários fosfatos e atuem como transfosforilas à pHs alcalinos (WU et al., 2013).

As ALPs são entidades ubíquas envolvidas em muitos processos biológicos, como a transdução de sinal para animais aquáticos. Por exemplo, a fosfatase alcalina não-específica de tecido é um marcador bem estabelecido de osteoblastos e formação óssea em peixes teleósteos. ALP desempenha um papel na imunidade inata dos peixes contra infecção patogênica, bem como ajuda na cicatrização de feridas (WU et al., 2013).

Tendo diversas aplicabilidades em diferentes ramos, a fosfatase alcalina é principalmente utilizada como uma ferramenta molecular biológica em diagnósticos laboratoriais (SHARIFIAN et al., 2017). Também têm se utilizado os níveis de ALPs em músculo de peixe como parâmetro para avaliar a qualidade do pescado (KUDA et al., 2004). ALPs imobilizadas em sensores foram utilizadas para detecção dos níveis de cafeína em bebidas, devido ao efeito inibidor desta substância sobre a atividade desta enzima (AKYILMAZ e TUREMIS, 2010). Utilizam-se também ALPs para determinação das concentrações de efeitos poluente causados pela dispersão de metais pesados, tanto antropologicamente, quando intrinsecamente em regiões de mares e rios (SINGH; SINGH, 2005). Quanto aos diferentes aspectos relacionados à fosfatase alcalina, a maioria dos conhecimentos atuais surge de estudos realizados em vertebrados superiores.

O Brasil conta com 3 mil espécies de peixes, dos quais um grande número com potencial para utilização dentro da piscicultura. Entretanto as principais espécies criadas em cativeiro no país são exóticas (tilápias, carpas e bagres americanos). O maior mercado para a Tilápia encontra-se na Ásia (produto congelado) e na América Central

(produto fresco), sendo estes continentes os maiores fornecedores. Porém observa-se um aumento na produção em países da América do Sul e África (FAO, 2016).

No Estado do Maranhão, a tilápia possui relevância econômica para as Áreas de Proteção Ambiental devido à sua utilização em empreendimentos de piscicultura, especialmente na região do Maracanã, próximo ao complexo industrial da capital maranhense (OLIVEIRA et al., 2016).

Propõe-se alternativas ao descarte dos subprodutos de peixes, na maioria das vezes feita de forma incorreta, amplamente consumidos pela população da ilha de São Luís – MA. Órgãos como cérebro, rins, gônadas, vesícula biliar, espinhas, baço e fígado podem apresentar quantidades enzimáticas de fosfatase alcalina consideráveis para extração, dando-lhes um novo destino e utilidade.

Desta forma, a prospecção da atividade enzimática de ALP proveniente de extrato bruto de diferentes órgãos de peixe, busca mensurar os níveis de atividade e destacar dentre os órgãos que são usualmente desprezados após filetagem, quais têm maior potencial para extração e obtenção da enzima visando a uma possibilidade mais viável para o descarte de resíduos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar resíduos do processamento da tilápia como potencial fonte de obtenção da enzima Fosfatase Alcalina para aplicações biotecnológicas.

2.2 Específicos

- Obter o extrato bruto de resíduos do processamento da Tilápia;
- Determinar a atividade enzimática específica da fosfatase alcalina (ALP) dos extratos obtidos;
- Dosar a concentração de proteínas dos extratos;
- Determinar Relação massa Órgão/ massa Corporal dos EBT's com maior atividade enzimática específica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Enzimas de uso biotecnológico

As enzimas são catalisadores biológicos essenciais à vida, sendo proteínas altamente evoluídas para desempenhar funções especializadas em células, tecidos e órgãos. São reagentes biológicos que estimulam continuamente as atividades vitais essenciais sob as condições experimentais e ambientais mais propícias. A maioria das enzimas são construídas a partir de um conjunto de 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente, com a exceção de poucos que são feitos de RNA (DEENI; SOJIMADE, 2015).

Sabe-se que as enzimas catalisam mais de 4000 reações diferentes e são capazes de catalisar diferentes etapas nas vias metabólicas. Cada enzima pode sofrer regulação de sua atividade, aumentando-a, diminuindo-a ou até mesmo interrompendo-a, a fim de modular o fluxo da via metabólica em que ela está inserida. Sem enzimas, as reações químicas no organismo seriam muito lentas, elas proporcionam maior eficiência, reduzindo a energia de ativação sem deslocar o balanço, exercendo assim seu poder catalítico (GOMES; ROCHA-SANTOS, 2018).

As enzimas são mais comumente empregadas na fabricação de alimentos (pão, queijo, cerveja e vinagre), produtos químicos finos (aminoácidos, vitaminas), agricultura (hormônios de crescimento, citocininas) e farmacêuticos (insulina). Porém com o crescente interesse em aplicações mais complexas enzimas especialmente projetadas ou engendradas tornaram-se biocatalizadores de escolha em relação aos quimicamente modificados, aumentando assim a versatilidade e a utilidade dos produtos no mercado global (PARTE; SIRISHA; D'SOUZA, 2017).

A atividade enzimática é uma medida da capacidade catalítica e existem dois métodos para medir a atividade da enzima: um deles é medir a diminuição da concentração de substrato em um período de tempo, e o outro é medir o aumento na concentração de um produto após um período de tempo (GOMES; ROCHA-SANTOS, 2018).

3.2 Resíduos de pescado

O gerenciamento sustentável de resíduos de pescado gerados pelo processamento de frutos do mar é um problema mundial. Barbatanas, vísceras, cabeça e carcaças são partes do peixe desperdiçadas durante o processamento (filetagem). A produção global de peixe gerou em 2014 aproximadamente 167 milhões de toneladas em peso total, desses 87,5% foram destinados para consumo humano e os 12,5% restantes foram destinados a produção de óleo de peixe e produção de ração (IVANOVVS; SPALVINS; BLUMBERGA, 2018). O aproveitamento de resíduos traz vantagens econômicas e de conservação de energia nos processos industriais (LEITE; SUCASAS; OETTERER, 2016).

Peixes oriundos do mar contabilizam cerca de 55% da produção mundial total, a aquicultura contabiliza os 45% restantes. Por volta de 70% dos peixes são processados antes de serem vendidos, 20 a 80% desse total é desperdiçado, dependendo do tipo de processamento e da espécie que está sendo processada ração (IVANOVVS; SPALVINS; BLUMBERGA, 2018).

As indústrias de pescados geralmente processam resíduos que representam um risco ao meio ambiente. Tecnologias para tratar esses resíduos, ou melhor ainda para recuperar alguns materiais orgânicos e dar-lhes uma aplicabilidade antes do descarte, são necessários para mitigar a poluição. Os resíduos da piscicultura afetam não apenas a área imediata, mas também podem alterar através da redução da biomassa, densidade e diversidade dos bentos, plâncton e nécton modificando as cadeias alimentares naturais (ARVANITTOYANNIS; TSERKEZOU, 2014).

Estes resíduos são considerados matéria-prima de baixa qualidade, que, na maioria dos casos, não é utilizada e constitui dejetos que causam prejuízos ecológicos, sanitários e econômicos. Estes dejetos, quando usados adequadamente, podem constituir um aporte de alto valor biológico na nutrição animal e um incentivo econômico importante para as indústrias que os produzem (MACHADO, 2010).

3.3 Tilapicultura no Brasil

A tilapicultura no Brasil teve início no ano de 1970. Embora não seja uma espécie nativa, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), principal espécie produzida no Brasil, foi introduzida, juntamente com a tilápia de Zanzibar (*Oreochromis hornorum*), pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em 1971. Os primeiros espécimes foram introduzidos pelo DNOCS com o intuito de proporcionar a produção de alevinos para o peixamento (espécie de repovoamento) dos reservatórios públicos da região Nordeste e para o fomento do cultivo (SCHULTER; VIEIRA FILHO, 2017).

A tilápia é produzida praticamente em todo o país, em criações geralmente feitas em tanques escavados e em tanques-rede. A maioria dos cultivos é de pequeno porte. Ao passar dos anos foram feitos alguns grandes investimentos individuais na produção e processamento, como a produção verticalizada, seguindo a tendência dos principais países exportadores da América Latina (KUBITZA, 2007).

Em relatório feito no ano de 2016 a FAO estima que o Brasil deve registrar um crescimento de 104% na produção da pesca e aquicultura até 2025. Segundo o estudo, o aumento na produção brasileira será o maior registrado na região, seguido de México (54,2%) e Argentina (53,9%) durante a próxima década. O crescimento no país se deve aos investimentos feitos no setor nos últimos anos (FAO, 2016).

No Nordeste os cultivos comerciais de tilápia eram praticamente inexpressivos até o ano de 2000. A partir deste ano então, a tilapicultura cresceu em um ritmo intenso, fazendo da região a maior produtora de tilápia do país. O clima favorável e a disponibilidade de açudes públicos gerenciados pelo estado favoreceram a rápida expansão dos cultivos em tanques-rede, impulsionados por um mercado regional receptivo aos produtos de tilápia (KUBITZA, 2007).

No Estado do Maranhão, a tilápia possui relevância econômica para as Áreas de Proteção Ambiental devido à sua utilização em empreendimentos de piscicultura,

especialmente na região do Maracanã, próximo ao complexo industrial da capital maranhense (OLIVEIRA et al., 2016).

3.4 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) foi descoberta em 1923 por Robert Robison, que sugeriu que esta enzima funcionava na mineralização do esqueleto através da liberação de fosfato inorgânico (Pi) para a propagação de cristais de hidroxiapatita (HA) (WHYTE, 2010).

A fosfatase alcalina (ALP, E.C.3.1.3.1.) é uma hidrolase fosfomonoéster não específica que catalisa a hidrólise de uma ampla variedade de monofosfatos orgânicos. A ocorrência generalizada de ALP na natureza sugere seu envolvimento em processos bioquímicos fundamentais, no entanto, não há evidências positivas em relação à sua função fisiológica ou à natureza dos substratos naturais. A hidrólise de fosfoésteres, a atividade da fosfatase transferase, a atividade da proteína fosfatase, o transporte de fosfato, a modulação do transporte de cátions orgânicos e o envolvimento na proliferação celular têm sido sugeridos como possíveis funções da ALP (MELTROVIĆ; PAVELA-VRANČIĆ, 2003).

As ALPs pertencem à superfamília de enzimas com atividades amplas, incluindo hidrolases, isomerasas e transferases. Como regra geral, os ALPs são enzimas homodiméricas, com cada monômero contendo cinco resíduos de cisteína e três íons metálicos, dois Zn ++ e um Mg ++ que são essenciais para a atividade das enzimas. ALPs catalisam a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico e reações de transfosforilação (LALLÈS, 2010).

ALPs apresentam diversas aplicabilidades. Sendo comumente usadas como ferramentas em biologia molecular e ensaios clínicos. Na área da indústria de alimentos marinhos, as atividades da fosfatase podem ser consideradas como um índice de frescor nos músculos dos peixes. A pasteurização de alimentos marinhos também pode ser medida por atividades da fosfatase alcalina. Nas pesquisas pesqueiras, mudanças no crescimento, doença e desova podem ser um índice das atividades da fosfatase. Resumindo, um dos possíveis e principais mecanismos para liberar o fosfato

biodisponível pode estar relacionado à atividade da fosfatase alcalina (SHARIFIAN et al., 2018).

Em muitos estudos de alimentos marinhos, atividades de fosfatases nos músculos dos peixes, particularmente atividades enzimáticas degradantes de ATP, ADP e IMP, foram relacionadas ao valor de K, um índice de frescor e os compostos de sabor umami. No entanto, as alterações das atividades da fosfatase e das bactérias do peixe durante a deterioração não estão bem esclarecidas (KUDA; MATSUMOTO; YANO, 2002).

REFERÊNCIAS

AKYILMAZ, Erol; TUREMIS, Mehmet. An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. **Electrochimica Acta**, [s.l.], v. 55, n. 18, p.5195-5199, jul. 2010. Elsevier BV.

ARVANITOYANNIS, Ioannis S.; TSERKEZOU, Persefoni. **Fish Waste Management**. [s.i.]: Wiley Blackwell, 2014. 510 p.

CHIRAMBO, George M; VAN NIEKERK, Chantal; CROWTHER, Nigel J. The role of alkaline phosphatase in intracellular lipid accumulation in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2. **Experimental And Molecular Pathology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.224-229, abr. 2017.

DEENI, Yusuf; SOJIMADE, Nuruddeen. **ENZYMES AND PROTEINS - A BIOTECHNOLOGY TAILORING POINT OF VIEW**. [s.i.]: Research Gate, 2015.

FAO Contributing to food security and nutrition for all. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Rome. 200pp, 2016.

GOMES, Ana Rita; ROCHA-SANTOS, Teresa A.p.. Enzyme Assays ☆. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, [s.l.], v. 3, p.549-554, 2018.

IVANOV, Kaspars; SPALVINS, Kriss; BLUMBERGA, Dagnija. Approach for modelling anaerobic digestion processes of fish waste. **Energy Procedia**, [s.l.], v. 147, p.390-396, ago. 2018.

KUBITZA, Fernando. Tilápias em bola de cristal. **Panorama da Aquicultura**, Jundiaí, v. 17, n. 99, p.14-21, fev. 2017.

KUDA, Takashi; MATSUMOTO, Chiharu; YANO, Toshihiro. Changes in acid and alkaline phosphatase activities during the spoilage of raw muscle from horse mackerel *Trachurus japonicus* and gurnard *Lepidotriga microptera*. **Food Chemistry**, [s.i], v. 76, n. 1, p.443-447, jul. 2002.

KUDA, Takashi; TSUDA, Noriko; YANO, Toshihiro. Thermal inactivation characteristics of acid and alkaline phosphatase in fish and shellfish. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 88, n. 4, p.543-548, dez. 2004. Elsevier BV.

LALLÈS, Jean-paul. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. **Nutrition Reviews**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.323-332, jun. 2010. Oxford University Press (OUP).

LEITE, Suzan Blima Paulino; SUCASAS, Lia Ferraz de Arruda; OETTERER, Marília. Resíduos da comercialização de pescado marinho – volume de descarte e aspectos microbiológicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 10, n. 1, p.2112-2125, jun. 2016.

MACHADO, Thaís Moron. **SILAGEM BIOLÓGICA DE PESCADO**. 2010. 13 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesca de Santos, Santos, 2010.

MELTROVIĆ, V.; PAVELA-VRANČIĆ, M.. Inhibition of alkaline phosphatase activity by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor. **Biochimie**, [s.l.], v. 85, n. 7, p.647-650, jul. 2003. Elsevier BV.

OLIVEIRA, Suelen Rosana Sampaio de et al. LESÕES HISTOPATOLÓGICAS COMO BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA EM *Oreochromis niloticus* (OSTEICHTHYES, CICHLIDAE) DE UMA ÁREA PROTEGIDA NO MARANHÃO. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, São Luís, v. 9, n. 1, p.12-26, 12 dez. 2016.

SCHULTER, Eduardo Pickler; VIEIRA FILHO, José Eustáquio Ribeiro. **Evolução da piscicultura no Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia**. 2017. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Institute Of Applied Economic Research (IPEA), Brasília, 2017.

SHARIFIAN, Sana et al. Production of newfound alkaline phosphatases from marine organisms with potential functions and industrial applications. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 64, p.103-115, jan. 2018. Elsevier BV.

SINGH, Digvijay; SINGH, Ajay. The toxicity of four native Indian plants: Effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. **Chemosphere**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.135-140, jun. 2005. Elsevier BV.

WHYTE, Michael P.. Physiological role of alkaline phosphatase explored in hypophosphatasia. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1192, n. 1, p.190-200, abr. 2010. Wiley.

WU, Hai-tao et al. Purification and characterization of alkaline phosphatase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Fisheries Science**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.477-485, 12 abr. 2013. Springer Nature.

**Artigo: PROSPECÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA EM
RESÍDUOS DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

A ser submetido ao periódico Química Nova

**PROSPECÇÃO DA ENZIMA FOSFATASE ALCALINA EM RESÍDUOS DE
TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*)**

^aMarllen Santos da Silva e Talita da S. Espósito^b

^aDepartamento de Biologia - DEBIO, Universidade Federal do Maranhão, 65065-545
São Luís – MA, Brasil

^bDepartamento de Oceanografia e Limnologia - DEOLI, Universidade Federal do
Maranhão, 65065-545 São Luís – MA, Brasil

PROSPECTION OF ALKALINE FOSFATASE ENZYME IN TILAPIA (OREOCHROMIS NILOTICUS) RESIDUES

Aquaculture has been growing significantly in Brazil with the focus on tilapia farming, in certain regions, mainly in the Northeast, with emphasis in the Environmental Protection Areas in Maranhão. The increase in the production of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is mainly due to the characteristics of the meat, providing a good acceptance of the fillet by the consumer market combined with the easeness of the cultivate. Defined as leftover from food processing, fish waste accounts for about 50% of the initial raw material that will not be use at the end of processing. Approximately 120 million tonnes/year of fish waste (bones, skin, fin, viscera and head) are improperly disposed in the environment. Enzymes of biotechnological interest can be extract from fish waste, thus giving them an economically viable destination. Alkaline Phosphatase (ALP) is an enzyme of interest in several branches of biotechnology, being commonly use as tools in molecular biology and clinical trials, in the field of marine food industry has its presence associated with the freshness level in fish muscles. Calculations of specific enzyme activity and protein dosage were perform in crude extracts from different tilapia organs as a means of measuring which were more viable to the extraction of ALP. Because of their higher specific activity (U / mg), the liver and tilapia kidney are the organs with the highest potential for extracting ALP. Organs that are usually discard are sources of biomolecules of broad biotechnological interest, presenting themselves as a way of adding value to the product and reducing environmental pollution.

Keywords: *Tilapiculture; Maranhão; Biotechnology; Processing.*

INTRODUÇÃO

A importância de enzimas na biotecnologia e biologia molecular fez com que se tornassem um objeto popular de estudo para utilização comercial⁹. Estima-se que o mercado global de enzimas tenha crescido em torno de 7% no ano de 2015, impulsionado pela busca de novas tecnologias enzimáticas para aplicações industriais, abordagem de questões ambientais, melhoramento da produtividade e agregação de valor a produtos de mercado⁴.

A enzima Fosfatase Alcalina (ALP) é uma fosfomonoesterase não-específica, capaz de hidrolizar uma ampla variedade de ésteres de fosfato para produzir fosfato inorgânico livre ou para transferir o grupo fosforila para outros álcoois⁸. A aplicação de ALP pode ser definida em várias áreas, porém é comumente utilizada como uma ferramenta na biologia molecular e em estudos clínicos⁹.

A aquicultura tem crescido consideravelmente nos últimos anos, com ênfase na Tilapicultura, e destaca-se como uma atividade produtora de proteína de origem animal representando um desafio para o controle de danos ambientais e exaurimento dos recursos pesqueiros. A resposta para estes desafios pode ser encontrada no desenvolvimento de avanços em bioprospecção marinha, aplicando tecnologias que satisfaçam a necessidade crescente de alimentos, medicamentos e materiais provenientes de recursos pesqueiros sem a exploração excessiva e a destruição dos ambientes costeiros¹².

O cultivo da Tilápia-do-Nilo tem sido expressivo, principalmente na região nordeste do Brasil. O aumento na produção da tilápia se deve às características relativas à carne, ao elevado valor nutricional, excelentes textura e paladar, proporcionando uma boa aceitação do filé, aliado à facilidade no cultivo¹⁰. Definidos como sobras do processamento de alimentos, de baixo valor comercial, os resíduos representam cerca de 50% da matéria prima inicial que não será aproveitada ao final do processamento do pescado. Desse modo, aproximadamente 120 milhões t/ano de resíduos de pescado (ossos, pele, nadadeira, vísceras e cabeça) são descartados indevidamente no ambiente. O aproveitamento de resíduos traz vantagens econômicas e de conservação de energia nos processos industriais³.

Diversos estudos demonstraram que os resíduos da indústria pesqueira podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de silagem, fertilizantes, farinha de

peixe, cosméticos e medicamentos, entre outros, gerando recursos para essa cadeia produtiva, maximizando os lucros e minimizando os⁵.

Desta forma o presente trabalho tem o intuito de apresentar uma alternativa ao desperdício dos resíduos de tilápia, tais como, as vísceras e dar um novo destino tendo como base o uso biotecnológico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e Soluções

Para obtenção do extrato líquido bruto EBT rico em fosfatase alcalina, estes foram preparados por homogeneização em tampão Tris-HCl 0,5 mol.l⁻¹, pH = 8,0 contendo 0,2% de TritonTM X-100 (SIGMA-ALDRICH), sendo armazenados em microtubos (ependorfs), em freezer (4°C).

Para a preparação da solução de albumina de soro bovino (BSA, SIGMA-ALDRICH) 1%, utilizou-se solução tampão Tris-HCl 1,0 mol.l⁻¹, pH = 7,2 na proporção 1mg/mL.

Na etapa de dosagem proteica total e atividade enzimática os reagentes utilizados foram respectivamente: solução de Bradford B6196 (SIGMA-ALDRICH) na proporção de 1/30 (amostra de proteína/ Bradford reagente).

Para determinação da atividade da ALP em diferentes órgãos, utilizou-se o substrato p-nitrophenyl phosphate (SIGMA-ALDRICH).

Métodos

Preparação do Extrato bruto dos cérebros de Tilápia (EBT)

Os peixes tilápia (*Oreochromis niloticus*) foram adquiridos no município de São Luís (Maranhão), em uma piscicultura localizado no bairro São Raimundo do Motor. Foram realizadas 2 coletas, nos meses de maio de 2018 (Coleta 1) e julho de 2018 (Coleta 2) com 7 e 6 exemplares respectivamente com massa corporal variando de 645-345g. Os exemplares foram sacrificados no gelo. Para a preparação do extrato bruto

(EBT), os rins, gônadas, fígados, corações, baços, cérebros e vesículas das tilápias foram removidos.

Os órgãos foram pesados e homogeneizados separadamente com solução tampão Tris-HCl (0,5 mol.l⁻¹, pH = 8,0) contendo 0,2% de Triton™ X-100 na proporção (0,1g de tecido por 1mL de solução tampão) no agitador mecânico IKA RW 20 Digital em rotação de 55 rpm. Após homogeneização, o extrato foi centrifugado a 15.000 xg por 20 minutos a 4°C para a remoção de partículas insolúveis, o sobrenadante foi denominado de Extrato Bruto (EBT) e estocado em freezer a 4°C.

Determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas

A atividade enzimática da ALP encontrada nos EBT's foi verificada em leitor de microplaca. Para um volume final de 200 µL, foi utilizado 140 µL de solução tampão Tris-HCL (0,5 mol.l⁻¹, pH = 8,0) contendo 0,2% de Triton™ X-100, 30 µL de EBT e 30 µL de substrato específico p-nitrophenyl phosphate. A formação do produto foi medida no comprimento de onda de 405 nm, após 6 minutos de reação (escuro).

Após medição espectrométrica, a absorbância foi calculada segundo a equação: $Abs_{405} = Abs_e - Abs_b$. Após foi realizado cálculo para atividade enzimática.

Para quantificação de proteínas totais encontrada nos EBT's, primeiramente foi construída uma curva com diluições seriadas de albumina para obtenção da equação da reta.

A quantificação de proteínas totais encontrada nos EBT's foi realizada segundo metodologia² e verificada em leitor de microplaca. Para um volume final de 200 µL, foram utilizados 50 µL de água destilada, 50 µL EBT (diluído 10x em solução tampão Tris-HCl, 0,5 mol.l⁻¹, pH = 8,0) e 150 µL do reagente Bradford B6196. A formação do produto foi medida no comprimento de onda de 630nm, após 15 minutos de reação (escuro). Após a medição, absorbância foi calculada segundo a equação da reta da curva de albumina: $y = bx + c$, onde y é a média das absorbâncias subtraído da média do branco.

A atividade enzimática específica de ALP em EBT's de *O. niloticus* foi calculada utilizando a seguinte equação: onde lia-se: $Atve_e = Abs_{405}/y$, lê-se: $Atve_e = \text{atividade enzimática} / \text{proteínas totais (U/mg)}$.

Determinação da relação massa Órgão/massa Corporal

Os EBT's dos órgãos com a maior atividade enzimática específica de ALP foram utilizados para avaliar a relação entre a massa Órgão e massa Corporal usando a seguinte fórmula: $ROC(\%) = \text{massa Órgão (g)} / \text{massa Corporal (g)} \times 100$, segundo metodologia TAVARES-DIAS et al., 2000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da Atividade Enzimática do EBT e concentração de proteínas

Na tabela 1 são apresentados os valores de atividade enzimática de ALP de diferentes órgãos da tilápia deste estudo. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar $1\mu\text{mol}$ de p-nitrophenyl phosphate.

Tabela 1: Atividade enzimática da ALP encontrada em EBT's de diferentes órgãos de *O. niloticus* (U/mL). P=peixe

Exemplar	Baço	Cérebro	Coração	Fígado	Gônada	Rim	Vesícula
P1	0,86	0,31	0,80	1,40	0,16	0,93	*
P2	1,05	0,23	0,44	0,94	0,12	1,42	0,16
P3	1,05	0,12	0,81	3,25	0,11	1,72	0,16
P4	1,19	0,13	0,50	1,38	0,13	*	0,12
P5	1,23	0,20	0,63	1,94	0,12	1,15	*
P6	0,69	0,15	0,58	1,20	0,13	1,31	0,08

*Dados não verificados.

Fonte: Autoria própria (2018)

De acordo com dados obtidos em literatura^{1,6}, os órgãos de *O. niloticus* com maiores concentrações de ALP são fígado, rim e guelra (não analisada neste estudo) sob condições naturais de cultivo. Os níveis de atividade enzimática de ALP encontrados em EBT's dos órgãos extraídos dos 6 exemplares de tilápia coletados nesta pesquisa, são maiores no fígado, rim e baço e em maior concentração no fígado do exemplar P3,

seguido do rim do exemplar P2. Os resultados obtidos neste trabalho mostram-se semelhantes à literatura encontrada e são corroborados por estudos prévios de atividade da ALP, comprovando a possibilidade de extração da enzima nos órgãos fígado e rim.

Os resultados da curva de albumina para quantificação de proteínas totais foram plotados em gráfico de dispersão, e após cálculos foi obtida a seguinte equação de reta: $y = 0,0253x + 0,0431$.

Os dados de absorvância das 40 amostras coletadas dos exemplares de *O. niloticus*, lidas em leitor de microplaca seguindo a metodologia de BRADFORD (1976) para quantificação de proteínas totais, foram substituídos na equação da reta: $x = (y - 0,0431) / 0,0253 \times 10$.

A dosagem de proteína total dos EBT's dos diferentes órgãos de tilápia é apresentada na tabela 2.

Tabela 2: Dosagem de proteínas totais (mg/mL) encontrada em EBT's de diferentes órgãos de *O. Niloticus*. P=peixe

Exemplar	Baço	Cérebro	Coração	Fígado	Gônada	Rim	Vesícula
P1	10,83	33,36	48,77	-20,36	22,49	159,05	*
P2	128,81	0,16	61,62	-16,840	20,12	134,15	-6,36
P3	133,75	5,30	152,53	176,84	62,02	196,60	-7,75
P4	205,10	44,03	127,83	179,80	117,35	*	-7,75
P5	122,89	-11,50	144,43	141,86	104,51	170,71	*
P6	108,46	60,63	130,99	135,53	42,06	127,43	6,88

*Dados não verificados.

Fonte: Autoria própria (2018)

Verificou-se a maior concentração de proteínas totais no EBT extraído do baço do exemplar P4, EBT extraído do rim do exemplar P3 e EBT extraído do fígado do exemplar P4, respectivamente. Os valores obtidos na quantificação de proteínas totais dos EBT's extraídos de *O. niloticus* confirmam a presença de concentrações proteicas nos órgãos já confirmados em metodologia anterior estudada (fígado, baço e rim).

A atividade enzimática específica (relação entre a atividade enzimática e a dosagem de proteínas dos extratos) dos EBT's de tilápia é apresentada na tabela 3.

Tabela 3: Atividade enzimática específica de ALP encontrada em EBT's de diferentes órgãos de *O. niloticus* (U/mg). P=peixe

Exemplar	Baço	Cérebro	Coração	Fígado	Gônada	Rim	Vesícula
P1	0,079	0,009	0,016	*	0,007	0,006	*
P2	0,008	*	0,007	*	0,006	0,011	-0,025
P3	0,008	0,023	0,005	0,018	0,002	0,009	-0,021
P4	0,006	0,003	0,004	0,008	0,001	*	-0,015
P5	0,010	-0,017	0,004	0,014	0,001	0,007	*
P6	0,006	0,002	0,004	0,009	0,003	0,010	0,012

* Dados não verificados.

Fonte: Autoria própria (2018).

Os EBT's com maior atividade enzimática específica apresentam valores menores que 1, desta forma sugere-se a purificação dos extratos obtidos a partir dos órgãos fígado e rim de *O. niloticus* para obtenção da enzima pura. Tais resultados sugerem que o fígado e o rim extraídos de resíduos de tilápia apresentam maior potencial para extração da enzima Fosfatase Alcalina para usos biotecnológicos.

Definidos os órgãos com maior atividade específica (U/mg), realizou-se o cálculo para determinação da porcentagem de ROC(%). Usando o fígado e o rim da tilápia para os cálculos. As seguintes fórmulas foram utilizadas: $RHS\% = \text{massa fígado (g)} / \text{massa corporal (g)} \times 100$ e $RNS\% = \text{massa rim (g)} / \text{massa corporal (g)} \times 100$.

Os resultados (%) da relação de massa do fígado e rim com a massa corporal total dos seis exemplares de Tilápia estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Relação Hepatosomática – RHS (%) e Relação Nefrossomática - RNS (%) de EBT's dos fígado e rim extraídos de *O. niloticus*. P=peixe

Exemplar	P1	P2	P3	P4	P5	P6
RHS%	1,13	1,41	1,89	1,52	0,68	1,80
RNS%	0,09	0,06	0,11	*	0,12	0,09

*Dados não verificados.

Fonte: Autoria própria (2018)

De acordo com literatura¹¹, existe uma relação diretamente proporcional entre a massa corporal total do peixe e a massa de seus órgãos. A RHS% para o exemplar P3 foi maior que os demais exemplares coletados, pois este apresentava maior massa corporal (645g), seguido do exemplar P4 (440g). O teste ANOVA obteve resultado de $p=0,99$, sendo $p<0,05$, demonstrando não haver diferença significativa entre os valores de RHS nos peixes analisados. A análise estatística comprova que peixes com diferentes valores de massa corporal (entre 100g a 650g) podem ser utilizados para extração da enzima Fosfatase Alcalina. Observando os resultados obtidos durante a prospecção da enzima fosfatase alcalina em EBT's extraídos de órgãos de *O. niloticus*, pode-se inferir que o maior exemplar de tilápia (P3) apresentou, portanto, os maiores valores para os testes de atividade enzimática, atividade enzimática específica, assim como maior Relação Hepatosomática avaliada. O exemplar P4 apresentou o maior valor para dosagem de proteínas totais,

Para a Relação nefrossomática (%), os valores obtidos não se mostraram diretamente proporcionais às medidas de massa corporal dos 6 exemplares de *O. niloticus* avaliados.

CONCLUSÃO

A prospecção de fosfatase alcalina em diferentes órgãos da tilápia sugere o fígado e rim deste peixe como fontes potencialmente viáveis para extrações desta enzima, podendo assim, agregar valor ao produto e diminuir problemas com a poluição ambiental devido ao descarte destes resíduos no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

1. Atencio, L. et al. *Toxicol., Biochem. Pathol. Mycotoxins*, **2008**, 36, 449.
2. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 248.
3. Leite, S. B. P.; Sucasas, L. F. A.; Oetterer, M. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, **2016**, 10, 2112.
4. Li, S. et al. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **2012**, 2, 1.
5. Martins, W. S. et al. *Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science*, **2017**, 54, .238.

6. Molina, R. et al. *Toxicon*, **2005**, 46, 725.
7. Parte, S.; Sirisha, V. I.; D'souza, J. S. *Marine Enzymes Biotechnology: Production and Industrial Applications, Part III - Application of Marine Enzymes*, **2017**, 75.
8. Park, T. et al. *Fems Microbiology Letters*, **1999**, 180, 133.
9. Sharifian, S. et al. *Process Biochem. Int.*, **2018**, 64, 103.
10. Souza, M. L. R. de; Maranhão, T. C. F., *Maringá, Acta Sci.*, 2001, 23, 897.
11. Tavares-Dias, M. et al. *Acta Sci.*, **2000**, 22, 533.
12. Teixeira, V. L. *Brasília, Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil*, **2010**, 37.

5.ANEXO

NORMAS DO PERIÓDICO QUÍMICA NOVA

Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção *Introdução* deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas da literatura não serão aceitas.

A seção *Parte Experimental* pode preceder ou vir após a seção *Resultados e Discussão*, mas devem ser necessariamente separadas. A seção *Conclusões*, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção *Resultados e Discussão*.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser inclusas no Material Suplementar (ver seção *Material Suplementar*).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os Editores poderão solicitar a revisão do idioma do manuscrito em qualquer etapa do processo de avaliação do manuscrito. Neste caso, os autores deverão apresentar um certificado de revisão por empresa/profissional especializado, que deve ser submetido pela plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do manuscrito.

2.3 Preparo dos manuscritos

Geral

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5×. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção Material Suplementar).

Detalhes

A primeira página deverá conter o *graphical abstract* (ver seção *Graphical Abstract*), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo - SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve ser o departamento. Em seguida devem ser indicados a faculdade/instituto, a universidade, o CEP, a cidade, o estado e o país. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito. Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico.
- Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;

A bactéria *Escherichia coli*...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

- Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;

15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);

10 m s⁻² (evitar m/s²);

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry*, *Abstracts Service*, *Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O *graphical abstract* deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões]. Junto com o *graphical abstract*, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.

A Figura 3 mostra o sistema utilizado...

(Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas)

As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser incluídas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações, mantendo inclusive a sequência numérica.

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}

Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³

salicilato de sódio,¹⁻³

Nishide *et al.*,⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}

(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>).

Caso o periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso.

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar *DOI* da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**.(CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas.

O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.s bq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS e numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.