

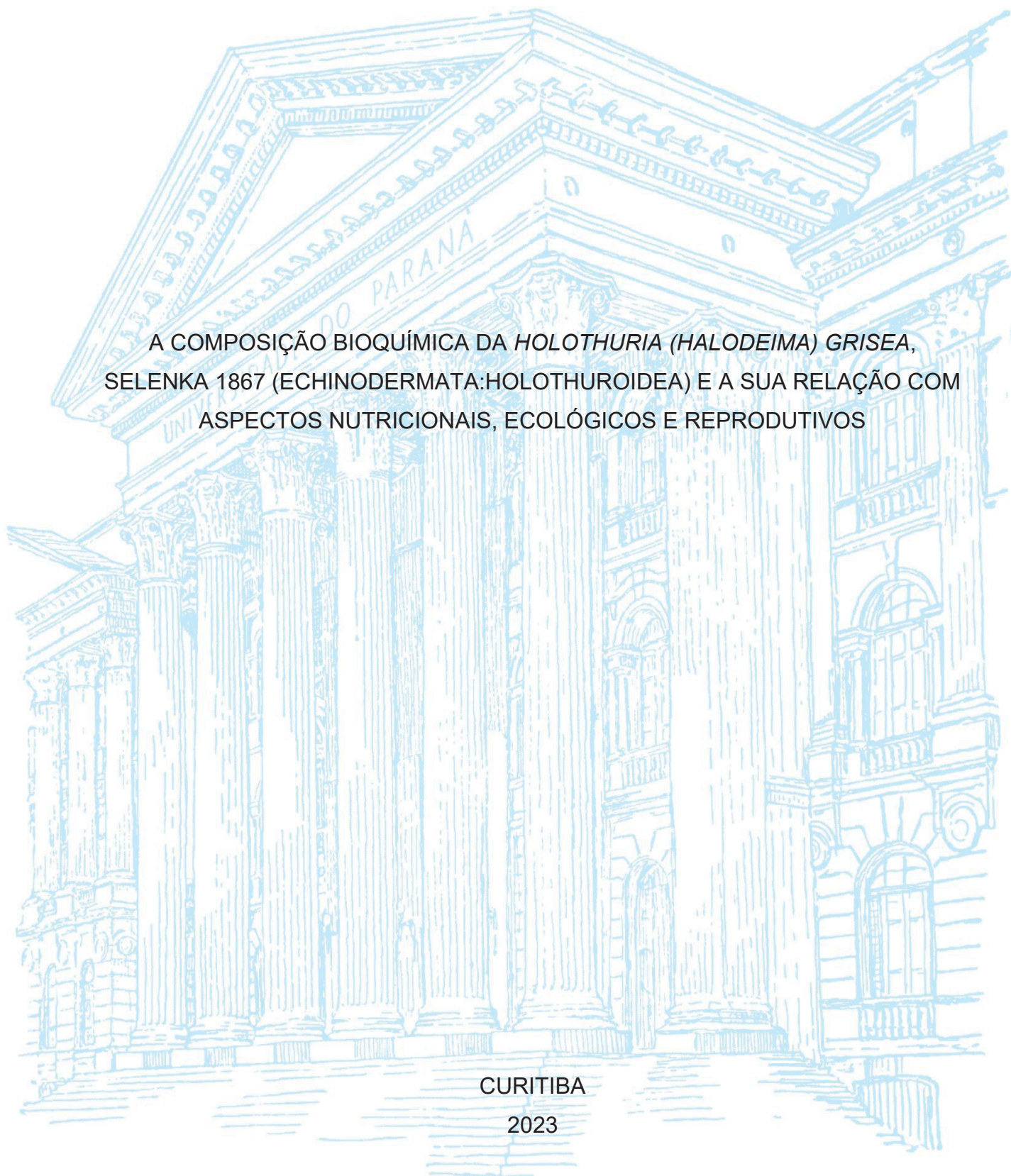
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATHEUS PIRES MIRANDA

A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA *HOLOTHURIA (HALODEIMA) GRISEA*,
SELENKA 1867 (ECHINODERMATA:HOLOTHUROIDEA) E A SUA RELAÇÃO COM
ASPECTOS NUTRICIONAIS, ECOLÓGICOS E REPRODUTIVOS

CURITIBA

2023



MATHEUS PIRES MIRANDA

A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA *HOLOTHURIA (HALODEIMA) GRISEA*,
SELENKA 1867 (ECHINODERMATA:HOLOTHUROIDEA) E A SUA RELAÇÃO COM
ASPECTOS NUTRICIONAIS, ECOLÓGICOS E REPRODUTIVOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Coorientador: Prof. Dr. Walter Ramos Pinto Cerqueira

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Miranda, Matheus Pires

A composição bioquímica da *Holothuria (Halodeima) grisea*, Selenka 1867 (Echinodermata: Holothuroidea) e a sua relação com aspectos nutricionais, ecológicos e reprodutivos / Matheus Pires Miranda. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki.

Coorientador: Prof. Dr. Walter Ramos Pinto Cerqueira.

1. Bioquímica. 2. Equinodermo. 3. Holothuria. 4. Reprodução. I. Sassaki, Guilherme Lanzi, 1975-. II. Cerqueira, Walter Ramos Pinto. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva. CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATHEUS PIRES MIRANDA** intitulada: **A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA HOLOTHURIA (HALODEIMA) GRISEA, SELENKA 1867 (ECHINODERMATA:HOLOTHUROIDEA) E A SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS NUTRICIONAIS, ECOLÓGICOS E REPRODUTIVOS**, sob orientação do Prof. Dr. GUILHERME LANZI SASSAKI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Agosto de 2023.

Assinatura Eletrônica

21/08/2023 16:13:00.0

GUILHERME LANZI SASSAKI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/08/2023 09:06:30.0

MARCELLO IACOMINI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

21/08/2023 20:42:56.0

YARA APARECIDA GARCIA TAVARES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

À todas as forças superiores em seus mais diversos nomes e representações que me sustentaram de maneira singular, discreta e substancialmente.

À minha família, parentes e não parentes, que em tudo me apoiaram e incentivaram, desde o primeiro comentário sobre fazer o mestrado fora da Bahia até o último instante da defesa, e que certamente continuarão.

Aos meus amigos e amigas que ouviram pacientemente minhas queixas, alegrias e tristezas. Pessoas que a distância não foi um obstáculo, mas um pretexto para conversar, em especial, Vanine, Lucas, Luana e Elson.

À Natalie Semanovschi, que foi uma parceira de campo, coleta, discussões, questionamentos e de longas horas de conversas e risos. Sua amizade permitiu fluidez e resistência nos momentos mais necessários.

À Prof.^a Yara Tavares, que foi um recanto nessa trajetória. Sua acolhida, empatia, compartilhamento de ideias, conselhos, entusiasmo científico e disponibilidade contribuíram para minha formação humana e profissional.

À Prof.^a Paula Lunardi, por todas as horas de escuta, cafés, risadas, reflexões e presença. Obrigado por ter dado espaço, ouvidos e compartilhado de minhas histórias. Un immense merci e até!

Ao Prof. Walter, por ter me apresentado o grupo dos equinodermos, pelo incentivo e atenção durante a pesquisa, pelas trocas de conhecimentos, pela rigorosidade científica, por me acompanhar desde a graduação e pelo exemplo acadêmico.

Ao Prof. Guilherme, por ter aceito me orientar, pela oportunidade, espaço disponibilizado e conhecimentos transmitidos.

Aos técnicos dos diversos laboratórios que se apresentaram acessíveis e solícitos, além de dar ideias e sugestões para melhorar os experimentos, a citar, Flávia, Arquimedes, Juliana e Rose.

À UFPR pela qualidade dos seus professores, seriedade e investimento na pesquisa científica.

À agência de fomento que financiou a pesquisa com bolsa de estudo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

“Eles pensam que a maré vai, mas nunca volta.
Até agora eles estavam comandando o meu destino
e eu fui recuando, recolhendo fúrias.
Hoje eu sou onda solta e tão forte quanto eles me imaginam fraca.
Quando eles virem invertida a correnteza,
quero saber se eles resistem à surpresa,
quero ver como eles reagem à ressaca.”
(Chico Buarque; Paulo Pontes, Gota D’água, 1977)

“Sou como a haste fina: qualquer brisa verga, mas nenhuma espada corta
Não mexe comigo, que eu não ando só.”
(Maria Bethânia, Carta de Amor, 2012)

RESUMO

O pepino-do-mar é um invertebrado marinho que possui grande interesse na culinária oriental por causa de suas características nutritivas e na pesquisa científica devido suas propriedades medicinais, dentre elas a ação antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e outras. Essas propriedades são resultado da presença de diversos compostos orgânicos distribuídos por todo corpo do animal, que por sua vez, contribuem tanto para o entendimento da sua biologia quanto para a pesquisa em saúde humana. O conhecimento da composição bioquímica é um pilar essencial para explicar, confirmar e/ou instigar estudos ecológicos e reprodutivos, uma vez que fornece dados cruciais para o entendimento da fisiologia desses organismos. Esse trabalho teve por objetivo determinar a composição bioquímica em relação aos lipídeos, proteínas e carboidratos totais e ácidos graxos da gônada, trato digestório e/ou parede do corpo de *Holothuria (Halodeima) grisea* e relacionar as informações bioquímicas com aspectos ecológicos, reprodutivos e abióticos nas estações inverno e verão. O ambiente foi caracterizado a nível de temperatura e salinidade da água no verão e no inverno. Medidas biométricas foram obtidas por pesagem dos tecidos úmido e liofilizado. As quantificações e caracterizações das biomoléculas foram obtidas combinando técnicas de extração com solventes orgânicos, espectrofotometria, cromatografia gasosa e espectrometria de massas. A identificação dos sexos foi realizada por meio de técnicas clássicas de histologia. Foram utilizados índices aterogênicos (IA), trombogênico (IT) e a razão hipocolesterolêmica/hipercolesterolêmica para avaliar de qualidade dos ácidos graxos. Os dados foram analisados estatisticamente por programa específico e submetidos a testes de acordo com sua natureza. Foram coletados 32 organismos, 12 no inverno e 20 no verão, e apresentaram diferenças significativas entre estações e/ou entre sexos para o peso total, peso úmido das gônadas, conteúdo do trato digestório, matéria orgânica, lipídeos e carboidratos totais. Em geral as fêmeas apresentam maiores quantidades de biomoléculas que os machos e essas flutuações estão relacionadas com a temperatura da água e o estágio reprodutivo. As cores das gônadas são influenciadas tanto por lipídeos, quanto pelo nível de maturação das gônadas e, dessa forma, não pode ser usada como único critério para determinação dos sexos. A dosagem das proteínas foi afetada pela concentração de sal e a análise desse efeito implicou em escolher o método de Biureto como o mais adequado em comparação com o Bradford. Os ácidos graxos coincidiram com o apresentado na literatura para pepinos-do-mar e os índices de qualidade nutricional revelaram-se melhores que outras espécies, além de indicar o verão como a estação ideal para consumo. Portanto, a *Holothuria (Halodeima) grisea* apresentou composição bioquímica variável entre as estações e sexos, sendo influenciada pela temperatura da água e dieta, e tem potenciais para ser utilizada em sistema de aquicultura.

Palavras-chave: Bioquímica. *Holothuria (Halodeima) grisea*. Equinodermos. Reprodução. Nutricional.

ABSTRACT

The sea cucumber is a marine invertebrate that has great interest in oriental gastronomy because of its nutritional characteristics and in scientific research due to medicinal properties, among them antioxidant, anti-inflammatory, antiviral and other actions. These properties are the result of the presence of several organic compounds distributed throughout the animal's body, contributing to the understanding of its biology and human health research. Knowledge of biochemical composition is an essential pillar to explain, confirm and/or instigate ecological and reproductive studies, as it provides crucial data for understanding of physiology organisms. This work aimed to determine the biochemical composition in relation to lipids, proteins and total carbohydrates and fatty acids of the gonad, digestive tract and/or body wall of *Holothuria (Halodeima) grisea* and to relate the biochemical information with ecological, reproductive and abiotic aspects in winter and summer seasons. The environment was characterized in terms of water temperature and salinity in summer and winter. Biometric measurements were obtained by wet and freeze-dried tissue weight. Quantifications and characterizations of biomolecules were obtained by combining organic solvent extraction techniques, spectrophotometry, gas chromatography and mass spectrometry. Sex identification was performed using classical histology techniques. Atherogenic (AI), thrombogenic (IT) indices and the hypocholesterolemic/hypercholesterolemic ratio were used to assess fatty acid quality. Data were statistically analyzed by specific software and submitted to tests according to their nature. Thirty-two organisms were collected, 12 in winter and 20 in summer, and showed significant differences between seasons and/or between sexes for total weight, gonad wet weight, digestive tract content, organic matter, lipids and total carbohydrates. In general females exhibit higher amounts of biomolecules than males and these fluctuations are related to water temperature and reproductive stage. Gonad colors are influenced by lipids and the level of gonad maturation and thus cannot be used as the only criterion for determining sexes. Protein determination was affected by salt concentration and analysis of this effect resulted in the choice of the Biuret method as the most appropriate compared to Bradford. The fatty acids coincided with those presented in the literature for sea cucumbers and the nutritional quality indices proved to be better than other species, in addition to indicating summer as the ideal season for consumption. Therefore, *Holothuria (Halodeima) grisea* showed variable biochemical composition between seasons and sexes, being influenced by water temperature and diet, and has potentials to be used in aquaculture system.

Keywords: Biochemistry. *Holothuria (Halodeima) grisea*. Echinoderms. Reproduction. Nutritional.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Pesca de mergulhador autônomo em Zanzibar, Tanzânia, consistindo de (do topo para baixo) <i>Thelenota anax</i> , <i>Holothuria fuscopunctata</i> , <i>Actinopyga miliaris</i> , <i>Holothuria fuscogilva</i> e <i>Thelenota ananas</i> (vertical). (b) Pepinos-do-mar secos à venda em Hong Kong. (c) Compradores em Hong Kong selecionando bêche-de-mer entre uma variedade de espécies (ERIKSSON <i>et al.</i> , 2015, p.436, tradução livre).....	20
Figura 2. Peso total (A-B) e IG (C-D) dos espécimes de <i>H (H) grisea</i> coletados no inverno e no verão (à esquerda) e entre macho e fêmea (à direita).....	31
Figura 3. Conteúdo do trato digestório (CTG) seco dos espécimes de <i>H. (H) grisea</i> coletados no inverno e no verão (à esquerda) e entre sexos (à direita).....	33
Figura 4. Matéria orgânica presente no trato digestório de machos e fêmeas de <i>H (H) grisea</i> no inverno e no verão.....	33
Figura 5. Gráficos de dispersão entre as variáveis matéria orgânica e CTG seco. (A) machos e fêmeas; (B) Inverno e verão.....	34
Figura 6. Lipídeos presentes na parede do corpo (A-B), trato digestório (C-D) e gônada (E-F) de <i>H (H) grisea</i> no inverno e verão e em macho e fêmea.....	35
Figura 7. Cortes histológicos utilizados para a sexagem e identificação do estágio da gametogênese em <i>H (H) grisea</i> : Proliferação (B e D); Em maturação (A e F); Maturação máxima (C e E), Emissão (G e H). As imagens A – D foram destaca os componentes celulares. Abreviações: Ov, ovócitos; EG, epitélio germinal; L, lúmen; SPZ, espermatozóide.....	36
Figura 8. Exemplos de gônadas de machos (M) e fêmeas (F) de <i>H (H) grisea</i> no inverno.....	37
Figura 9. Exemplos de gônadas de machos (M) e fêmeas (F) de <i>H (H) grisea</i> no verão.....	38
Figura 10. Proporção relativa das cores presente nas gônadas de fêmeas e machos de <i>H (H) grisea</i> no inverno. As notações N7, N8, N9, 10YR 8/6, 5RP 7/8, 5RP 7/4, 10YR 8/6, 7,5RP 7/10 e 5B 6/6 correspondem ao sistema de identificação de cores de Munsell. As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.....	39

Figura 11. Variabilidade de cores de acordo com o estágio reprodutivo dos organismos coletados no inverno. A esquerda é representada o estágio das fêmeas e a direita dos machos. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (Bueno <i>et al.</i> , 2015; TAVARES <i>et al.</i> , 2022). As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.....	40
Figura 12. Relação entre os estágios reprodutivos identificados em machos e fêmeas de <i>H (H) grisea</i> do inverno e lipídeos das gônadas. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO <i>et al.</i> , 2015; TAVARES <i>et al.</i> , 2022).....	40
Figura 13. Proporção relativa das cores presente nas gônadas de fêmeas e machos de <i>H (H) grisea</i> no verão. As notações N7, 10YR 8/6, 5RP 7/8 e 5B 6/6 correspondem ao sistema de identificação de cores de Munsell. As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.....	41
Figura 14. Variabilidade de cores de acordo com o estágio reprodutivo dos organismos coletados no verão. A esquerda é representada o estágio das fêmeas e a direita dos machos. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO <i>et al.</i> , 2015; TAVARES <i>et al.</i> , 2022). As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.....	42
Figura 15. Relação entre os estágios reprodutivos identificados em machos e fêmeas de <i>H (H) grisea</i> do verão e lipídeos das gônadas. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO <i>et al.</i> , 2015; TAVARES <i>et al.</i> , 2022).....	42
Figura 16. Frequência dos diferentes estágios de maturidade para machos e fêmeas de <i>H (H) grisea</i> . Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO <i>et al.</i> , 2015; TAVARES <i>et al.</i> , 2022).....	43
Figura 17. Curvas de calibração de glicose. (A) Verão; (B) Inverno.....	44
Figura 18. Massa de carboidratos em 100 mg da parede do corpo de <i>H (H) grisea</i> em machos e fêmeas do inverno (A) e entre as estações inverno e verão (B).....	44

Figura 19. Curva de calibração de albumina sérica humana em 3,5 % NaCl. (A) Método de Bradford; (B) Método do Biureto.....	45
Figura 20. Quantidade de proteínas solúveis em 100 mg da parede do corpo de espécimes de <i>H (H) grisea</i> nas estações inverno e verão (A) Método de Biureto; (B) Método de Bradford.....	46
Figura 21. Porcentagem relativa das classes de ácidos graxos por tecido de <i>H (H) grisea</i> coletada no inverno (a) e no verão (b).....	50
Figura 22. Proposta de vias metabólicas de carotenoides em pepino-do-mar.....	62
Figura 23. Esquema químico para ensaio colorimétrico de proteína.....	85
Figura 24. Curvas de calibração de ASH na presença de diferentes concentrações de NaCl. (A) Método de Bradford; (B) Método do Biureto.....	87
Figura 25. Quantidade de proteínas solúveis em 100 mg da parede do corpo de espécimes de <i>Holothuria grisea</i> pelo método de Biureto e Bradford.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do teste de correlação de Pearson (r) entre as variáveis peso total, CTG seco e matéria orgânica. Em (a) dados do inverno, em (b) dados do verão.....	33
Tabela 2. Composição de ácidos graxos (%) da parede do corpo (P), gônada (G) e trato digestório (TG) de <i>H</i> (<i>H</i>) <i>grisea</i> no inverno.....	48
Tabela 3. Composição de ácidos graxos (%) da parede do corpo (P), gônada (G) e trato digestório (TG) de <i>H</i> (<i>H</i>) <i>grisea</i> no verão.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Síntese das informações sobre aspectos macroscópicos (cor) de gônadas de holoturóides descritos na literatura.....	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ΔM	- Tamanho da diferença entre as médias
ARA	- Ácido araquidônico
ASH	- Albumina sérica humana
CHCl_3	- Clorofórmio
CTG	- Conteúdo do trato digestório
DHA	- Ácido docosahexaenóico
EI	- Ionização eletrônica
EPA	- Ácido eicosapentanóico
GC-MS	- <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
h/H	- Razão hipocolesterolêmica/hipercolesterolêmica
H_2SO_4	- Ácido Sulfúrico
IA	- Índice aterogênico
IT	- Índice trombogênico
m/z	- Relação massa/carga
MeOH	- Metanol
MeOH-HCl	- Metanol:HCl
Min	- Minutos
mL	- Militros
MUFA	- Ácido graxo monoinsaturado
N_2	- Nitrogênio
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
NIST	- National Institute of Standards and Technology
PSU	- Unidades de salinidade prática
PUFA	- Ácido graxo poliinsaturado
SFA	- Ácido graxo saturado
Ltd	- <i>Limited company</i>
CO	- <i>Company</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

© - copyright

°C - graus *Celsius*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA <i>H (H) GRISEA</i>, SELENKA 1867 (ECHINODERMATA:HOLOTHUROIDEA) E A SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS NUTRICIONAIS, ECOLÓGICOS E REPRODUTIVOS.....	16
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 BIOQUÍMICA, VALOR NUTRICIONAL E ECONÔMICO	17
1.2 ECOLOGIA.....	21
1.3 REPRODUÇÃO.....	22
2 OBJETIVOS.....	23
3 QUESTÃO NORTEADORA	24
4 METODOLOGIA	24
4.1 ÁREA DE COLETA E CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL.....	24
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	24
4.3 HISTOLOGIA E ESTÁGIO DA GAMETOGÊNESE	25
4.4 AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DE CORES DAS GÔNADAS	25
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA	26
4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS	26
4.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS	27
4.8 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS	27
4.9 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR DERIVATIZAÇÃO EM METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS (FAME).	28
4.10 IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO CROMATOGRAMA E CÁLCULO DA PORCENTAGEM RELATIVA.....	28
4.11 ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DE LIPÍDEOS	29
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE.....	30
5.2 BIOMETRIA E TEOR HÍDRICO	30
5.3 CONTEÚDO DO TRATO DIGESTÓRIO E MATÉRIA ORGÂNICA.....	32
5.4 LIPÍDEOS TOTAIS.....	34
5.5 HISTOLOGIA, ANÁLISE DE CORES E LIPÍDEOS DAS GÔNADAS.....	36
5.6 CARBOIDRATOS TOTAIS.....	43

5.7	PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	45
5.8	COMPOSIÇÃO RELATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS	46
5.9	ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DE LIPÍDEOS	51
6	DISCUSSÃO	51
6.1	BIOMETRIA E TEOR HÍDRICO	51
6.2	CONTEÚDO DO TRATO DIGESTÓRIO E MATÉRIA ORGÂNICA.....	53
6.3	LIPÍDEOS TOTAIS	54
6.4	HISTOLOGIA, ANÁLISE DE CORES E LIPÍDEOS DAS GÔNADAS.....	56
6.4.1	Histologia.....	56
6.4.2	Análise de cores e lipídeos das gônadas	57
6.5	CARBOIDRATOS	60
6.6	PROTEÍNAS SOLÚVEIS.....	61
6.7	COMPOSIÇÃO E ÍNDICE DE QUALIDADE DE ÁCIDOS GRAXOS.....	63
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXO 1 – CROMATOGRAMA DE LIPÍDEOS PRESENTES EM <i>H (H) GRISEA</i>..	83
	CAPÍTULO 2 - COMPARAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO	
	DE SÓDIO NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS ENTRE OS MÉTODOS DE	
	BRADFORD E BIURETO	84
1	INTRODUÇÃO	84
2	MATERIAL E MÉTODOS	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
	REFERÊNCIAS.....	91

CAPÍTULO 1 - A COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA *HOLOTHURIA (HALODEIMA) GRISEA*, SELENKA 1867 (ECHINODERMATA:HOLOTHUROIDEA) E A SUA RELAÇÃO COM ASPECTOS NUTRICIONAIS, ECOLÓGICOS E REPRODUTIVOS

1 INTRODUÇÃO

Os holoturóides, também conhecidos como pepinos-do-mar, são invertebrados marinhos que apresentam muitas espécies de grande interesse na culinária oriental em função de suas propriedades medicinais e nutritivas (CONAND, 2007). Vários estudos versam no reconhecimento de aspectos tanto sobre a biologia básica do grupo quanto em possíveis aplicações comerciais. Na última década podem ser exemplificados trabalhos desenvolvidos com relação à ecologia (PURCELL *et al.*, 2016; SUSETYA *et al.*, 2020), a reprodução (GIANASI *et al.*, 2016), a anatomia, a fisiologia, a composição nutricional (LIU *et al.*, 2017; KÜNILI; ÇOLAKOĞLU, 2019) aos potenciais efeitos farmacológicos e medicinais (PANGESTUTI; ARIFIN, 2017; KHOTIMCHENKO, 2015) e na identificação de compostos orgânicos (POMIN, 2014; WULANDARI; SYAHPUTRA; PUTRA, 2020).

A combinação de informações bioquímicas e ecológicas é um caminho promissor para elucidar os comportamentos reprodutivos com vistas ao cultivo desses animais. Relações entre a composição bioquímica e o período reprodutivo foram apontados por Tanikawa, Arkiba e Yoshitani (1955) e Vergara e Rodríguez (2016) com a identificação de mudanças nos níveis lipídicos durante a fase de crescimento gonadal. Segundo Hudson *et al.* (2003), essas flutuações estão fortemente relacionadas a disponibilidade alimentar e padrões reprodutivos interespecíficas

Dessa maneira, essa pesquisa se propõe a integrar os quatro aspectos: bioquímico, nutricional, ecológico e reprodutivo. O primeiro se refere aos dados bioquímicos resultantes das extrações de lipídeos e carboidratos; o segundo se refere a utilização desse organismo como recurso alimentar para os seres humanos, por ser um recurso marinho cultivável e com possibilidades de ser comercialmente explorado; o terceiro e o quarto ao conhecimento das interações entre o organismo e o ambiente externo e interno, bem como a sua fisiologia e reprodução.

A espécie estudada foi a *Holothuria (Halodeima) grisea* que é considerada uma espécie tropical de águas rasas e distribuída geograficamente no Atlântico

Norte, Flórida e Caribe, no Atlântico Sul, Brasil e Oeste da África (PAWSON *et al*, 2009) e no Mar da China Meridional (SUN *et al*, 2008).

1.1 BIOQUÍMICA, VALOR NUTRICIONAL E ECONÔMICO

As holotúrias apresentam vários metabólitos secundários com funções antifúngicas, citotóxicas, hemolíticas, antiviral dentre outras. (MONDOL *et al.*, 2017). Esses compostos orgânicos podem ser glicanos neutros, peptídeos, glicoesfigolipídeos, fenóis, ácidos graxos poliinsaturados, glicosídeos triterpênicos (saponinas), sulfato de condroitina fucosilado, dentre outros (KHOTIMCHENKO, 2018). Pomin (2014) descreve os efeitos do glicosaminoglicano exclusivo de pepino-do-mar, sulfato de condroitina fucosilada, que possui ação antitrombótica, anti-inflamatória, antiviral e angiogênica. Bastos (2011) identificou que esse composto inibe a citoaderência parasitária em células pulmonares e a reinvasão de eritrócitos por merozoítos da *P. falciparum* e Huang *et al.* (2013) verificou a capacidade de inibir a reprodução de cepas do HIV-1 em condições laboratoriais. Ustyuzhanina *et al.* (2020) constatou que o sulfato de condroitina da *Paracaudina chilensis* e *Holothuria hilla* apresenta atividades anticoagulantes.

Esses organismos frequentemente são submetidos a análises de composição bioquímica a fim de verificar quais condições ambientais, nutritivas e sazonais são mais favoráveis para serem cultivadas e consumidas. Algumas espécies já tiveram, do ponto de vista nutricional, sua composição bioquímica (lipídeos, carboidratos e/ou proteínas) quantificada, como a *Holothuria forskali* (DAVID, 2020), *Australostichopus mollis* (LIU *et al*, 2017), *Holothuria tubulosa* (KÜNİLİ; ÇOLAKOĞLU, 2019), *Cucumaria frondosa* (GIANASI *et al*, 2016), *Holothuria pavra*, *Holothuria arenicola* (SALARZADEH *et al*, 2012) dentre outras.

A parte mais utilizada no consumo humano é a musculatura da parede do corpo, que pode ser degustada cru ou preparada e representa 80-90% do peso do animal (KINCH *et al.*, 2008; HAMEL; MERCIER, 2008; AHMED *et al.*, 2022). A gônada e o trato digestório podem ser descartados durante o processamento manual ou consumidos, apesar de ser menos frequente (KINCH *et al.*, 2008; EECKHAUT *et al.*, 2012). O conhecimento da composição bioquímica de seus órgãos como gônadas, trato digestório e músculos, torna-se, portanto, um fator de alta relevância pois influencia diretamente as práticas de manejo sustentável e conservação das espécies (GIANASI *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2020).

Do ponto de vista nutricional, as holotúrias são ricas em Vitamina A, B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), minerais (Cálcio, Magnésio, Zinco e Ferro), ácidos graxos e proteínas. As proteínas da parede do corpo apresentam proporções variáveis na composição desses organismos (de 2.5 até 92.6%), sendo o colágeno responsável por 70% (BORDBAR; ANWAR; SAARI, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2015). Os principais tipos de proteínas da musculatura são as miofibrilares (actina e miosina), sarcoplasmáticas (mioglobina, calpaína, enzimas glicolíticas e oxidativas mitocondriais) e estromais (colágeno, fibronectina e elastina) (MAKOVICKÝ; JÍLEK, 2008; BOLAND *et al.*, 2018). Tais moléculas desenvolvem um papel singular tanto no metabolismo e organização estrutural dos pepinos, quanto na sua utilização como recurso alimentar, sendo constituintes essenciais para a manutenção da homeostase humana (Mæhre *et al.*, 2018).

As holotúrias armazenam em seus órgãos ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA). A variedade do perfil de ácidos graxos se expande aos de cadeia ímpar, geralmente encontrados nos óleos vegetais, como o C15:0, C17:0, C19:0, C21:0 e C23:0 (BORDBAR; ANWAR; SAARI, 2011). Uma classe importante para a saúde humana são os ácidos graxos essenciais ômega-3 e ômega-6, encontrados na forma de ácido eicosapentanóico (EPA), ácido araquidônico (ARA), ácido linoleico (LA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (DAS, 2006; YAHYAVI *et al.*, 2012). Esses ácidos graxos ajudam a reduzir os níveis de colesterol e triglicerídeos (SROYRAYA *et al.*, 2017) e auxiliam na prevenção de doenças coronarianas, diabetes, artrite e outros (GAO; XU; YANG, 2011). Além disso, a composição lipídica influencia diretamente o sucesso reprodutivo desses organismos, já que são os ácidos graxos a principal reserva nutritiva utilizada na sobrevivência e no desenvolvimento da larva (HOEGH-GULDBERG; EMLET, 1997; BYRNE; CERRA, 2000; VILLINSKI *et al.*, 2002; PROWSE *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos poliinsaturados não são sintetizados pelo corpo humano e precisam ser obtidos através da alimentação. As fontes dietéticas mais comuns dessa classe de ácido graxo são os cereais, leite humano, ovos, óleo de girassol, de milho, e de oliva, fungos e vísceras de animais, como fígado e rins (DAS, 2006). Os organismos marinhos como algas, peixes e invertebrados, como os equinodermos, são ricos em EPA e DHA (SWANSON; BLOCK; MOUSA, 2012; ZHUKOVA, 2022). Nos humanos, a deficiência desses ácidos graxos contribui para o desenvolvimento

de desordens no desenvolvimento do cérebro e em condições neurológicas como o Alzheimer, Parkinson, degeneração espinocerebelar e esquizofrenia (DAS, 2006).

Os carboidratos presentes nas holotúrias podem ser glicoconjugados ou homo e heteropolissacarídeos, como cerebrosídeos, sulfato de condroitina fucosilado, glicogênio e saponinas (POMIN, 2014; MONDOL *et al.*, 2017; USTYUZHANINA *et al.*, 2020) que podem apresentar atividade antifúngica, anti-inflamatória, anticoagulante, antiviral e outras (KANG; SEO; PARK, 2015). Além dos efeitos fisiológicos, o conhecimento do teor de carboidratos é relevante para a determinação do valor nutricional e comercial dos produtos alimentícios derivados do pepino-do-mar (AZAM; SINGH, 2013; OEDJOE, 2017). Em geral, os carboidratos representam entre 0,2 – 2,2% da parede do corpo (CHANG-LEE; PRICE; LAMPILA, 1989).

Dessa forma, organismos com melhor valor nutricional possuem maior valor agregado. Parâmetros como odor, cor, tamanho, aparência e espessura da parede do corpo também são utilizados para distinguir e selecionar os produtos disponíveis no mercado. Outro parâmetro de bastante relevância é a palatabilidade (DREWNOWSKI, 1992), determinada pela composição bioquímica tecidual, que por sua vez é afetada diretamente por fatores ambientais como o habitat, a dieta, a disponibilidade de alimento, a temperatura e a variação sazonal (ARDIANSYAH *et al.*, 2022).

O preço das holotúrias varia a depender do tamanho e da espécie, sendo vendidos desde US\$ 3.583 a US\$ 22 por kg, em que a espécie *Apostichopus japonicus* é a mais cara e a *Thelenota anax* a mais barata (figura 1) (PURCELL; WILLIAMSON; NGALUAFA, 2018). Os principais exportadores de pepinos são os países em região tropical, ultrapassando 83 países. Na América Latina e regiões Caribenha destacam-se o Equador, Cuba, Peru, Chile, Panama e Costa Rica (BORDBAR; ANWAR; SAARI, 2011; ERIKSSON *et al.*, 2015). A exploração desse recurso marinho tornou-se uma alternativa a pescados tradicionais como peixes, crustáceos e moluscos e uma oportunidade para o desenvolvimento socioeconômico e de subsistência de comunidades locais (ANDERSON; LOTZE; SHACKELL, 2008; OCHIEWO *et al.*, 2010).

Figura 1. (a) Pesca de mergulhador autônomo em Zanzibar, Tanzânia, consistindo de (do topo para baixo) *Thelenota anax*, *Holothuria fuscopunctata*, *Actinopyga miliaris*, *Holothuria fuscogilva* e *Thelenota ananas* (vertical). (b) Pepinos-do-mar secos à venda em Hong Kong. (c) Compradores em Hong Kong selecionando bêche-de-mer entre uma variedade de espécies (ERIKSSON *et al.*, 2015, p.436, tradução livre).



FONTE: ERIKSSON *et al.*, (2015)

As informações bioquímicas além de contribuir para a regulamentação no uso nutricional, fornecem valiosos dados para a compreensão da biologia desses organismos. Os trabalhos aplicados a ecologia das holotúrias abrangem a caracterização da dieta, da alocação de recursos e a eficiência digestiva com base na composição de pigmentos e ácidos graxos dos tecidos (DAVID *et al.*, 2020); a relação entre a dieta com o tamanho, o peso e a composição dos músculos, gônadas e intestino, entre macho e fêmea (SUN *et al.*, 2020) e a influência do habitat na composição bioquímica (GONZÁLEZ-WANGÜEMERT *et al.*, 2018).

1.2 ECOLOGIA

Os holoturóides se distribuem em diferentes ecossistemas como os recifes de corais, costões rochosos, pradarias marinhas, parcialmente sobre areia ou lama; desde a região do entremarés (em ambientes de águas rasas) até profundidades abissais (KINCH *et al.*, 2008; SUSETYA *et al.*, 2020). Essa ampla distribuição faz com que cada espécie utilize diferentes estratégias para a obtenção de alimento e possuam atributos anatômicos e fisiológicos específicos para cada tipo de habitat e sedimento associado (FLOREN *et al.*, 2021). Possuem habito suspensívoro-detrítivo – podendo coletar através dos seus tentáculos orais, partículas (detritos) orgânicos, microrganismos, fitoplâncton, zooplâncton do sedimento ou em suspensão (PURCELL *et al.*, 2016).

Análises do conteúdo do trato digestório revelam que as holotúrias apresentam um amplo espectro alimentar, desde compostos inorgânicos, micro (diatomáceas) ou macroalgas, cifozoários, nematodas, copepodas, exoesqueletos quitinosos (crustáceos) e calcáreos (moluscos) até materiais de origem sintética (UTHICKE; KAREZ, 1999; GRAHAM; THOMPSON, 2009; PAWSON; PAWSON; KING, 2010; XIA *et al.*, 2012). A seletividade na ingestão do sedimento, portanto, pode ocorrer a depender de fatores conjuntos como: tamanho e textura da superfície da partícula, dos processos mecânicos e morfologia dos tentáculos orais (TAGHON, 1989) e principalmente pela quantidade de matéria orgânica distribuída na área superficial das partículas (MAYER, 1989; TAGHON, 1989).

A dieta e a disponibilidade de alimento estão associadas com a preferência alimentar e o sedimento onde vivem, e sua compreensão é uma importante informação ecológica que possibilita delinear dietas artificiais e/ou naturais. Essas dietas podem ser usadas na aquicultura para potencializar o crescimento somático e gonadal, melhorar a palatabilidade (DWORJANYN; PIROZZI; LIU, 2007), entender as interações tróficas, teias alimentares, estratégias de alimentação (HO; PENNINGS, 2008) e compreender o requerimento, mobilização e estocagem de biomoléculas para a sobrevivência do animal e para reprodução (LOWE; LAWRENCE, 1976).

A variação sazonal acompanhada das flutuações na temperatura da água, afetam significativamente a fisiologia dos organismos ectotérmicos, como o período reprodutivo, a liberação de gametas, a ingestão de nutrientes, a respiração, a biomassa, e por consequência, a composição de proteínas, carboidratos e lipídeos

dos tecidos (GAO; XU; YANG, 2011; KAUTSARI *et al.*, 2020). Essas flutuações mobilizam distintas demandas metabólicas que intensificam ou atenuam as vias de síntese e/ou degradação das biomoléculas, a transcrição de genes, a estrutura das proteínas, a atividade enzimática, a permeabilidade da membrana plasmática dentre outros (PHAN *et al.*, 1993; JÖNSSON, 1997; KÜHNHOLD *et al.*, 2017; VENÂNCIO *et al.*, 2022).

1.3 REPRODUÇÃO

As holotúrias são organismos dioicos e possuem sistema reprodutor composto por uma única gônada, ramificada em vários túbulos com espessura e comprimento variável que convergem para um único gonoduto. A fertilização é externa com desenvolvimento indireto e pelo menos duas fases larvais (GAO; YANG, 2015). Geralmente, a cor das gônadas é utilizada como parâmetro macroscópico para determinar o sexo e o estágio reprodutivo, porém, ela varia entre espécies e entre os estágios, não podendo ser utilizada como único atributo para diagnose do sexo devido a elevada variabilidade (quadro 1) ((MARQUET *et al.*, 2017; SETIAWATI *et al.*, 2021).

Quadro 1. Síntese das informações sobre aspectos macroscópicos (cor) de gônadas de holoturóides descritos na literatura.

Referência	Espécie	Coloração da gônada	Desenvolvimento sexual
Marquet <i>et al.</i> (2017)	<i>Holothuria arguinensis</i>	laranja claro, rosa claro, creme, castanho.	♀ maturo, ♀ crescimento, ♂ maturo, ♀♂ emissão
	<i>Holothuria mammata</i>	laranja claro/intenso, branco, vermelho intenso, berge, castanho.	♀ crescimento, ♂ crescimento, ♀ maturo, ♂ maturo, ♀♂ emissão
Hamel; Himmelman; Dufresne, 1993.	<i>Psolus fabricii</i>	creme	♂ imaturo
		rosa	♂ maturo
		marrom avermelhado	♀ maturo
Setiawati <i>et al.</i> , 2021	<i>Stichopus hermanni</i> e <i>Stichopus variegatus</i>	laranja	♂ maturo
Omar <i>et al.</i> , 2013	<i>Bohadschia vitiensis</i> ,	vermelho	♀♂ maturo
		branco amarelado	♀♂ imaturo

A maturação das gônadas também é acompanhada por diferentes proporções de lipídeos, principalmente nos ovócitos, que armazenam lipídeos na vesícula vitelínica e/ou distribuído pelo citoplasma em forma de gotículas ao longo da vitelogênese (LEVITAN, 2000; PROWSE *et al*, 2009). Para as larvas, sejam lecitotróficas ou planctotrófica, eles desempenham função de reserva nutritiva e são de extrema importância para a sua sobrevivência e desenvolvimento, representando uma fonte de energia prontamente disponível (PROWSE *et al.*, 2009; BYRNE; CERRA, 2000; VILLINSKI *et al*, 2002).

Componentes lipídicos também podem ser mobilizados para a manutenção do metabolismo ou durante um momento de maior demanda, como períodos de estresse ou para a fase de crescimento e maturidade de gametas (DJAWDAN *et al.*, 1996; GURR *et al*, 2016). Nematódeos, insetos, crustáceos e equinodermos realizam um processo de translocação de lipídeos entre demais órgãos e/ou tecidos para as gônadas durante o período reprodutivo (MARTIN, 1969; JIANG *et al*, 2009; HANSEN; FLATT; AGUILANIU, 2013).

A compensação ou preparação energética para esse investimento pode acontecer de dois modos: O animal pode adquirir os recursos e estocá-los previamente ou aumentar sua taxa de consumo durante o período reprodutivo (JÖNSSON, 1997). Devido a intensa atividade metabólica, a manutenção das funções somáticas para sobrevivência e a abundante proliferação de células germinativas, a reprodução torna-se um processo energeticamente custoso (HANSEN; FLATT; AGUILANIU, 2013).

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve por objetivos: a) determinar a composição bioquímica em relação aos lipídeos, proteínas e carboidratos totais e ácidos graxos da gônada, trato digestório e/ou parede do corpo em indivíduos de *H (H) grisea* em um trecho da costa Paranaense; b) relacionar as informações bioquímicas com aspectos ecológicos, reprodutivos e abióticos nas estações inverno e verão e entre sexos.

3 QUESTÃO NORTEADORA

A composição bioquímica de *H (H) grisea* do litoral do Paraná ao nível de carboidratos, proteínas, lipídeos totais e ácidos graxos, dos tecidos gônada, parede do corpo e/ou trato digestório varia entre as estações do ano e entre os sexos?

Há variação entre as medidas biométricas de peso, teor hídrico da parede e da gônada, o conteúdo seco e matéria orgânica do trato digestório entre as estações do ano e entre os sexos?

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREA DE COLETA E CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL

A coleta dos exemplares de *H (H) grisea* foi realizada em 27 de Julho (inverno) de 2022 e 27 de Janeiro de 2023 (verão), na Praia de Guaratuba, Paraná, Brasil (25° 53' 23" S e 48° 33' 41" W), em um trecho do afloramento rochoso (entremarés) do Morro de Brejatuba (SCREMIN, FURQUIM E DUBIASKI-SILVA, 2013). A busca ativa dos maiores indivíduos deu-se por observação *in situ* e foram coletados randomicamente. Cada animal foi pesado, acondicionado separadamente em sacos plásticos *zip-lock* contendo água do mar e anestesiados em gelo e mentol. Para a caracterização do ambiente, foi registrada a temperatura da água do mar com um termômetro de mercúrio. O pH e a salinidade foram analisados em um pHmetro de precisão (Fisher Scientific accumet AB15/15+ Basic) e em um refratômetro de mão (Shanghai Precision & Scientific Instrument CO. Ltd, Q767-3) respectivamente.

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No laboratório, cada indivíduo foi limpo e eviscerado com material cirúrgico para separação da parede do corpo (com musculatura, ≈ 15 g), gônadas, trato digestório e o conteúdo do trato digestório (CTG). A contribuição das gônadas no peso total do animal foi determinada pelo índice gonadal (IG): (peso úmido das gônadas)/(peso úmido total X 100) (TAVARES; BORZONE, 2006).

A parede do corpo foi cortada em pequenos pedaços e triturada com o auxílio de um homogeneizador de tecido do tipo dispersor ultrarrápido acoplado a uma haste inoxidável com hélice dupla. Uma porção da gônada fresca foi retirada e fixada em formol 10%. Os tecidos foram pesados, congelados, liofilizado por 48 horas, novamente pesados e armazenados. O teor hídrico foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Teor hídrico (\%)} = \frac{\text{Peso úmido} - \text{Peso liofilizado}}{\text{Peso úmido}} \times 100$$

4.3 HISTOLOGIA E ESTÁGIO DA GAMETOGÊNESE

Para a sexagem e determinação dos estágios gametogênicos, a porção da gônada fixada foi processada por histotécnica padrão. O tecido foi desidratado em uma série crescente de etanol por 1 hora cada (70%, 80%, 90%, 95%, absoluto I e absoluto II - 100%). Em seguida, foram diafanizados em xilol (I e II) por 1 hora e impregnados em parafina líquida (*Overnight*, 12 horas/ 60-65 °C), emblocados, seccionados (7 µm) em com micrótomo manual (tipo Minot) e fixados em lâminas com solução de albumina e glicerina (1:1, v/v) (SANTOS *et al.*, 2021).

Para a coloração das lâminas histológicas, o material foi desparafinado com xilol (I e II), por 10 minutos cada, hidratados em uma série decrescente de etanol (absoluto I, absoluto II - 100%, 95%, 90%, 80% e 70%) e, por fim, com água destilada, por 1 minuto cada. Em sequência, foram corados com Hematoxilina e Eosina (SANTOS *et al.*, 2021). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus, modelo CX43) com aumentos de 4X e 10X, as fotomicrografias foram obtidas com câmera EP50 integrada ao *software* EPview 1.3.

Os estágios foram definidos seguindo a proposta de Bueno *et al.* (2015) e Tavares *et al.* (2022), com algumas modificações: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão e apresentados graficamente em forma de frequência relativa.

4.4 AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE DE CORES DAS GÔNADAS

As cores das gônadas frescas foram determinadas por meio de comparação visual e relativa aos padrões de cores do sistema de Munsell (SOIL SURVEY DIVISION STAFF, 2017). Nesse sistema leva-se em consideração os parâmetros Matiz, Valor e Croma, em que Matiz (cor dominante), Valor (tonalidade/luminosidade) e Croma, pureza (fraca/forte). A notação para a identificação corresponde as cores principais R (red-vermelho), Y (yellow-amarelo), G (green-verde), B (blue-azul) e P (purple-roxo) e as cinco cores intermediárias YR (yellow-red – laranja ou amarelo-vermelho), GY (green-yellow – verde-amarelo), BG (blue-green – azul-verde), PB (purple-blue – roxo-azul) e RP (red-purple – vermelho-roxo). A notação N 10 – 0 corresponde a variação do preto (0) ao branco (10).

O matiz varia em unidades de 2,5; o valor entre 0 – 10, onde 0 é o preto absoluto e 10 o branco absoluto; e o croma entre 0 – 10, onde 0 são as cores neutras (branco, cinza e preto) e 10 (cores mais vivas) (GUIMARÃES; 2016; SOIL SURVEY DIVISION STAFF, 2017). Foram construídos gráficos de frequência relativa para representar as cores das gônadas e os estágios reprodutivos. As cores dos gráficos são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA

Para determinação do teor de matéria orgânica do conteúdo do trato digestório foi empregado o método de incineração e análise de cinzas usando o forno tipo mufla. As amostras foram colocadas em placa de Petri e previamente secas em estufa a 105 °C por 2 horas. Em seguida, foram transferidas para um pedaço de papel alumínio, pesadas, acondicionadas em cadinhos de porcelana, colocadas em forno tipo mufla, incineradas a 550 °C por 2 horas (DEAN, 1974; HEIRI; LOTTER; LEMCKE, 2001), resfriadas em dessecador por 1 hora e 30 minutos e pesadas em balança analítica. A quantidade de matéria orgânica foi determinada por gravimetria.

4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS

A extração foi realizada com 100 mg da parede do corpo liofilizada e fragmentada, utilizando como solvente água destilada, razão de 1:30 (g/v), em agitação constante por 4 horas, à 90 °C. O extrato foi filtrado, concentrado em rotaevaporador, congelado e liofilizado.

A quantificação dos carboidratos foi realizada por espectrofotometria. As amostras foram solubilizadas em 12, 16 ou 20 mL de água destilada. Em um tubo de ensaio foi adicionado 500 µL da amostra, 2,5 mL de H₂SO₄ e 0,5 mL de Fenol 5%. Em seguida, foi agitado em vórtex, aguardou-se 10 min e colocado em banho maria 25 °C – 35 °C, por 15 minutos para o desenvolvimento de cor (DUBOIS *et al.*, 1956). Para construção da curva padrão, foram utilizados 0, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µL da solução glicose padrão (100 µg/mL) e as absorbâncias foram lidas em 490 nm. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

A extração de proteínas solúveis foi realizada segundo método descrito por Mæhre *et al.* (2018), com algumas modificações. Em aproximadamente 100 mg da parede do corpo liofilizada e fragmentada, foi adicionado 4 mL da solução de 0.1 M hidróxido de sódio (NaOH) em 3,5% de cloreto de sódio (NaCl), pH 12. Em seguida, a amostra foi sonicada por 15 minutos e mantida à 60 °C, em agitação constante, por 90 minutos. Após o período determinado, a mistura foi novamente sonicada por 15 minutos, centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos à 4 °C, retirado o sobrenadante e armazenado. O resíduo foi lavado com 2 mL da solução de extração, vortexado por 10s e centrifugado por 15 minutos (DELIMA; TRIO, 2019). Os sobrenadantes foram combinados e liofilizados.

A quantificação das proteínas solúveis foi realizada por espectrofotometria utilizando o método de Bradford (1976) e o do Biureto (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949). As amostras foram solubilizadas em 5 mL de água destilada para o teste do Biureto e em seguida foi retirada uma alíquota de 0,5 ml e diluída 10 vezes para o teste de Bradford. Foi seguido o protocolo padrão de microplaca para os dois ensaios colorimétricos. Em resumo, 50 µL do padrão, branco (solução de extração) e do extrato foram adicionados em diferentes poços da microplaca e em seguida adicionou-se 250 µL do reagente de Bradford (Sigma Aldrich) ou do reativo de Biureto. Agitou-se a microplaca levemente por 20 segs e esperou 15 minutos antes de realizar a leitura. A curva padrão para o teste de Bradford foi construída com 0, 10, 20, 30, 40 e 50 µl da solução padrão de albumina sérica humana (200 µg/mL) e a do Biureto com 0, 10, 15, 20, 25, 40, 45 e 50 µL da solução padrão de albumina sérica humana (3,0 mg/mL). As absorbâncias foram lidas em 595 nm e 540 nm para os respectivos métodos, Bradford e Biureto. O experimento foi realizado em triplicata.

4.8 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

Aproximadamente 0,5 g da parede do corpo, a gônada e o trato digestório completos foram picados e pulverizados para a extração. Foi utilizado o sistema de solventes CHCl₃/MeOH (3:1, v/v), razão de 1:30 (g/v), em agitação constante por 2 horas, à temperatura ambiente. Os extratos foram filtrados com papel filtro quantitativo (Whatman), evaporados com fluxo de N₂, quantificados por gravimetria em balança analítica e armazenados a – 18 °C (BLIGH; DYER, 1959).

4.9 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR DERIVATIZAÇÃO EM METIL ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS (FAME).

Amostras de 1 - 3 mg foram dissolvidas em 600 μ L de MeOH-HCl 1 N e mantidos a 100 °C por 2 horas. Foram particionadas com 1 mL hexano e 1 mL água destilada e a porção apolar (hexano) foi coletada. Em seguida foi evaporada sob fluxo de N₂, dissolvida em acetona e analisada no GC-MS (ICHIHARA; FUKUBAYASHI, 2010; CHIU; KUO, 2020). As análises de GC-MS foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás (GC) acoplado a um espectrômetro de massa (ionização eletrônica – EI) de marca SHIMADZU QP2020NX, com varredura entre 30 e 1000 m/z , energia de geração de elétrons de 70 eV e equipado com coluna capilar DB-5 ms (SHIMADZU) de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestida (SANTANA FILHO, 2013).

O gás Hélio foi utilizado para o arraste à uma pressão de 119 kPa e fluxo de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi 250 °C. A programação de temperatura foi de 100 °C por 2 min, seguida pelo aumento de 5 °C/min até 280 °C e mantida por 7 min. O tempo total da programação foi de 45 min. A temperatura da fonte de íons foi 300 °C e razão de *split* de 1:10.

4.10 IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO CROMATOGRAMA E CÁLCULO DA PORCENTAGEM RELATIVA

Os ácidos graxos foram analisados utilizando o software GCMS Postrun Analysis 4.2 e identificados pelo tempo de retenção e pelas fragmentações dos picos do cromatograma. Com base no tempo de retenção e no tipo de coluna (DB-5ms) utilizada, os analitos se comportavam da seguinte maneira: a) quanto maior o comprimento da cadeia, maior o tempo de retenção; b) cadeias insaturadas possuem menor tempo de retenção que o seu respectivo saturado; c) cadeias insaturadas são eluídas de acordo com o número de ligações duplas, quanto mais ligações, maior o tempo de retenção (DOMMES; WIRTZ-PEITZ; KUNAU, 1976; MCCURRY, 2012).

Os picos base utilizados para o reconhecimento foram o m/z 74 formado por rearranjo de *McLafferty* para ésteres metílicos saturados, os íons m/z 55, 67 e/ou 69 para os monoinsaturados e o íon m/z 79 para os poliinsaturados. Para essa última classe também foi observado os íons de fragmentação m/z 91,108,122,150,194 e/ou 236 (MJØS, 2004). Em sequência, foi verificada se a identificação coincidia com as

informações da biblioteca de espectros de massas NIST14. A determinação da composição relativa em porcentagem foi obtida por meio da integral manual da área de cada pico de ácido graxo multiplicado por 100 e dividido pelo somatório de todas as integrais por amostra.

4.11 ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DE LIPÍDEOS

Foram utilizados os índices aterogênicos (IA), trombogênico (IT) e a razão hipocolesterolêmica/hipercolesterolêmica (h/H) para avaliação da qualidade nutricional dos ácidos graxos presentes na parede do corpo de *H. (H) grisea*, segundo a abordagem de Biandolino *et al.*, (2022):

$$IA = \frac{[(C12:0)+(4 \times C14:0) + (C16:0)]}{[\sum n-6 + \sum n-3 + \sum MUFA]}$$

$$IT = \frac{[(C14:0) + (C16:0) + (C18:0)]}{[0.5 \times \sum MUFA) + (0.5 \times \sum n-6) + (3 \times \sum n-3) + (\frac{\sum n-3}{\sum n-6})}$$

$$\frac{h}{H} = \frac{(C18:1+C18:2+C18:3+C20:3 +C20:4+ C20:5+C22:4+C22:5+C22:6)}{(C14:0+C16:0)}$$

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com o Software GraphPad Prism®, versão 8.0.2 (263). Todos os dados foram inicialmente submetidos a testes de Normalidade (Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) para avaliar o comportamento da distribuição das amostras (MIOT, 2017). Os que apresentaram distribuição normal foram analisados através dos testes paramétricos: *t* de Student (não pareado) e/ou coeficiente de Pearson. Os não paramétricos foram analisados através dos testes Mann Whitney, Friedman e/ou Kruskal-Wallis, a depender dos dados. As médias são apresentadas com o desvio padrão ($\pm$). O gráfico box plot foi construído utilizando as seguintes condições: os limites superior e inferior são os valores mínimo e máximo com *outlier*, a linha e quadrado no intervalo interquartilico é a mediana e a média, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE

O ambiente no momento da coleta apresentou as seguintes características: No inverno o pH foi de 7.34, temperatura da água do mar 20 °C e a salinidade de 36 unidades de salinidade prática (PSU) e no verão pH foi de 8.0, temperatura da água do mar 29 °C e 34 PSU.

5.2 BIOMETRIA E TEOR HÍDRICO

Foram coletados 32 organismos, 12 no inverno e 20 no verão. A média do peso total dos organismos do inverno e verão, foi, respectivamente, 198.3 ± 40.6 g e 142.8 ± 37.2 g, com diferença significativa (p 0.0004) e tamanho da diferença entre as médias de (ΔM) 55.0 ± 14.05 g (figura 2A). Não houve diferença significativa entre sexos (p 0.3688) (figura 2B). O IG do verão foi maior que do inverno, com média de $3.68 \pm 2.19\%$ e $0.914 \pm 0.84\%$, respectivamente, com diferença significativa (p 0.0003, ΔM 2.76 ± 0.66) (figura 2C). Não houve diferença estatística de IG entre sexos (p 0.1837) (figura 2D). No entanto, com relação ao peso total da gônada, foi observado diferença significativa para as fêmeas do inverno (p 0.0279, ΔM 2.11 ± 0.82 g).

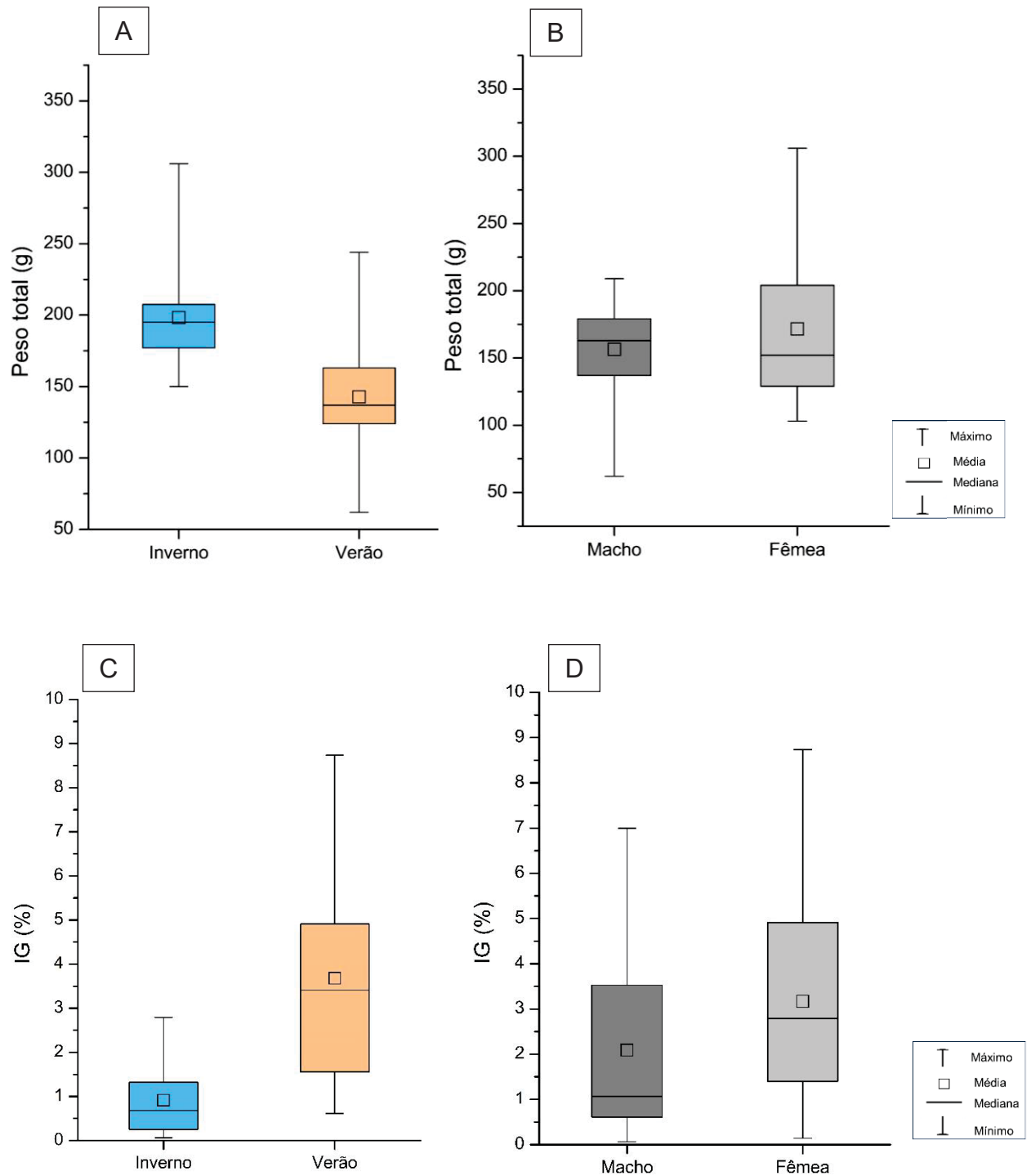
O teor hídrico da parede do corpo e gônada entre sexo e estação está apresentado na tabela 1. Houve diferença significativa apenas no teor hídrico da gônada entre sexos (p 0.0018, ΔM 4.63 ± 1.34 %).

Tabela 1. Teor hídrico da parede do corpo e gônada de *H. (H) grisea* entre estações e sexos.

	Teor Hídrico	
	Parede do corpo	Gônada
Inverno	$85.3 \pm 1.4\%$	$87.5 \pm 4.2\%$
Verão	$84.5 \pm 1.4\%$	$87.5 \pm 4.6\%$
Macho	$84.8 \pm 1.7\%$	$85.2 \pm 3.7\%$
Fêmea	$84.8 \pm 1.1\%$	$89.9 \pm 3.7\%$

FONTE: O autor (2023)

Figura 2. Peso total (A-B) e IG (C-D) dos espécimes de *H (H) grisea* coletados no inverno e no verão (à esquerda) e entre macho e fêmea (à direita).



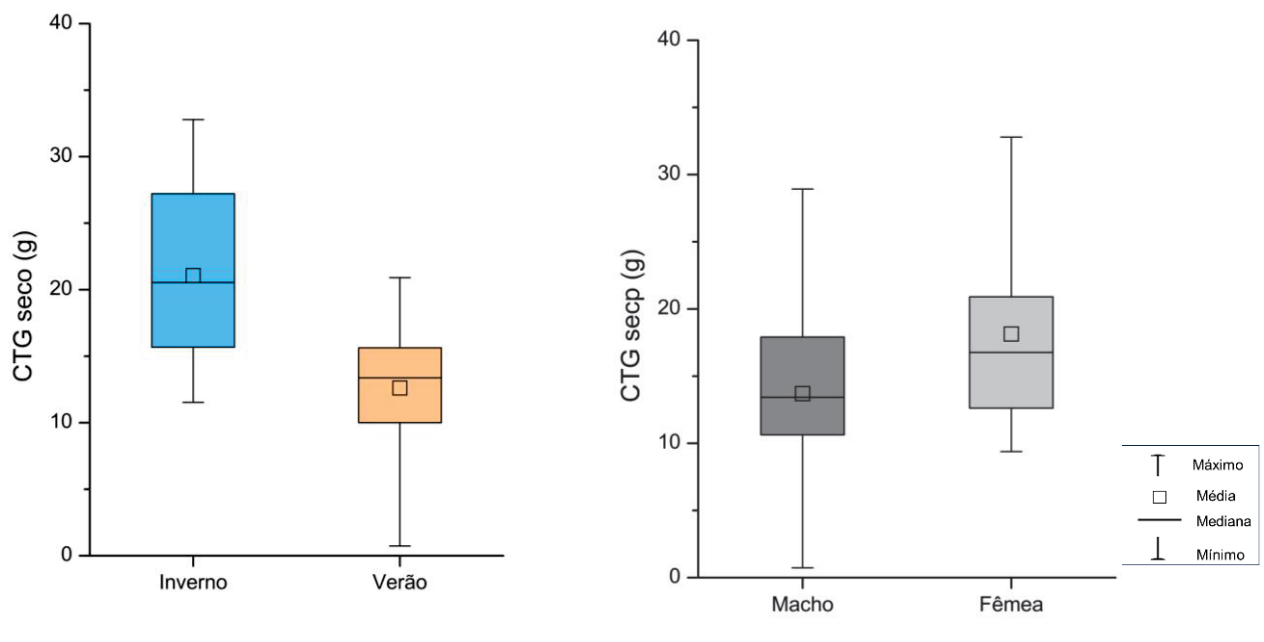
FONTE: O autor (2023)

5.3 CONTEÚDO DO TRATO DIGESTÓRIO E MATÉRIA ORGÂNICA

O conteúdo do trato digestório (CTG) seco no inverno e no verão foi em média, respectivamente, 21.1 ± 6.9 g e 12.6 ± 5.1 g, com diferença significativa (p 0.0005, ΔM 8.47 ± 2.15 g) (figura 3). Os machos e fêmeas apresentaram médias de 13.7 ± 7.1 g e 18.1 ± 6.7 g, respectivamente (figura 3). No verão, as fêmeas apresentaram maior CTG seco e diferença significativa (p 0.009, ΔM 5.7 ± 1.9 g).

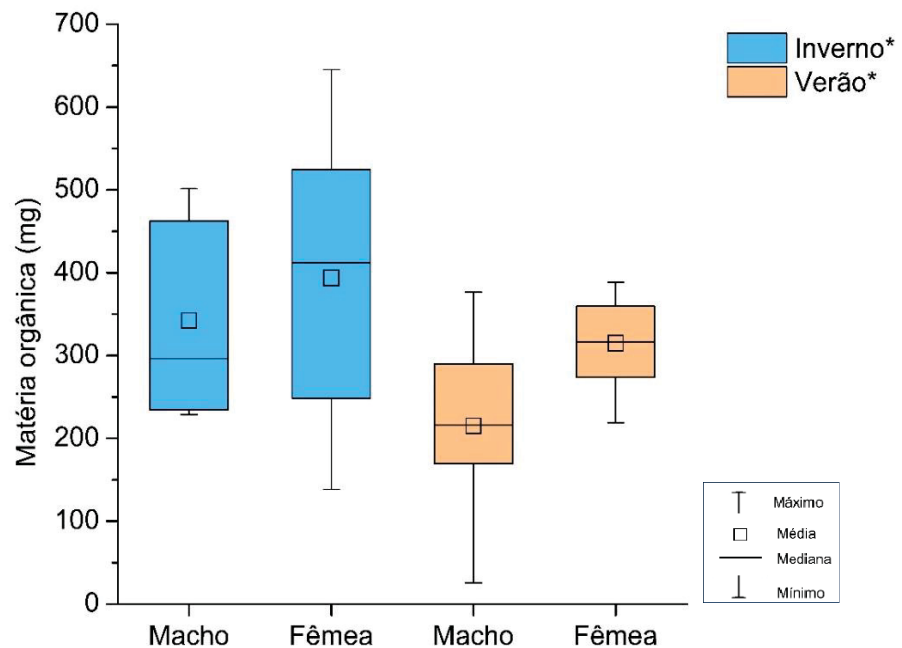
A média de matéria orgânica no inverno e verão foi de 363.7 ± 153.8 mg e 264.9 ± 97.8 mg, respectivamente, com diferença significativa (p 0.0334, ΔM 98.7 ± 44.3 mg) (figura 4). Os machos e fêmeas possuíam médias de 267.4 ± 126.3 mg e 341.1 ± 124.5 mg, respectivamente, sem diferença significativa (p 0.1076) (figura 4). No verão, as fêmeas apresentaram maior quantidade de matéria orgânica e diferença significativa (p 0.0178, ΔM 99.8 ± 38.2 mg).

Figura 3. Conteúdo do trato digestório (CTG) seco dos espécimes de *H. (H) grisea* coletados no inverno e no verão (à esquerda) e entre sexos (à direita).



FONTE: O autor (2023)

Figura 4. Matéria orgânica presente no trato digestório de machos e fêmeas de *H (H) grisea* no inverno e no verão.

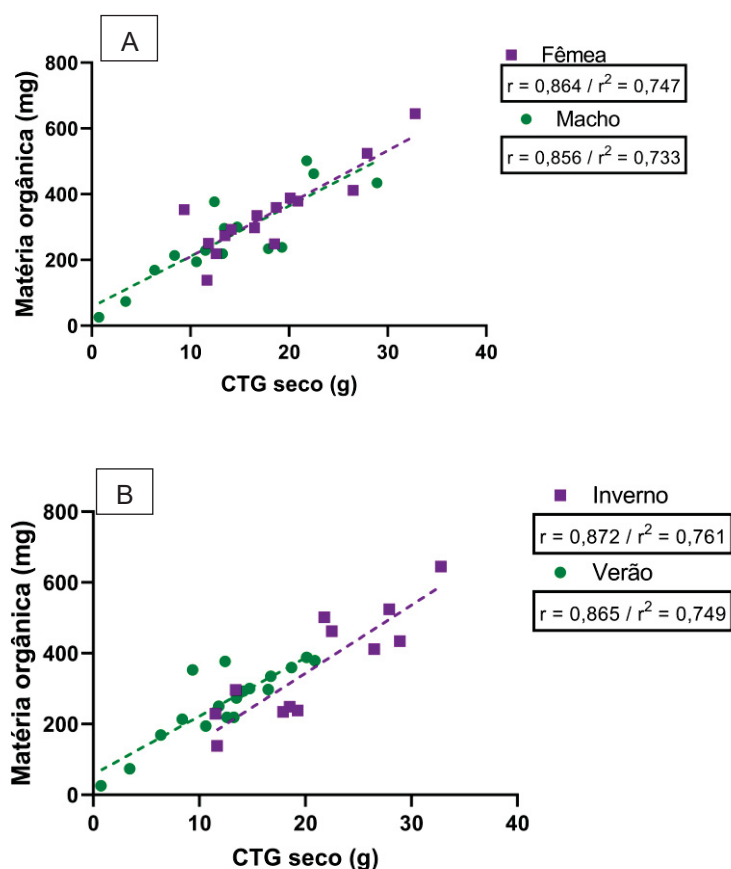


FONTE: O autor (2023)

O teste de correlação de Pearson (r) demonstrou que há correlação positiva e forte entre o CTG seco e matéria orgânica entre as estações e entre os sexos. Dessa forma, os dados de cada variável se comportam de maneira crescente e conjunta (figura 5).

Na triagem qualitativa do conteúdo do trato, foi encontrado areia, cracas, algas, fragmentos de conchas de bivalves, endoesqueleto de bolacha do mar, exoesqueleto de caranguejo e fragmentos de vidro.

Figura 5. Gráficos de dispersão entre as variáveis matéria orgânica e CTG seco. (A) machos e fêmeas; (B) Inverno e verão.

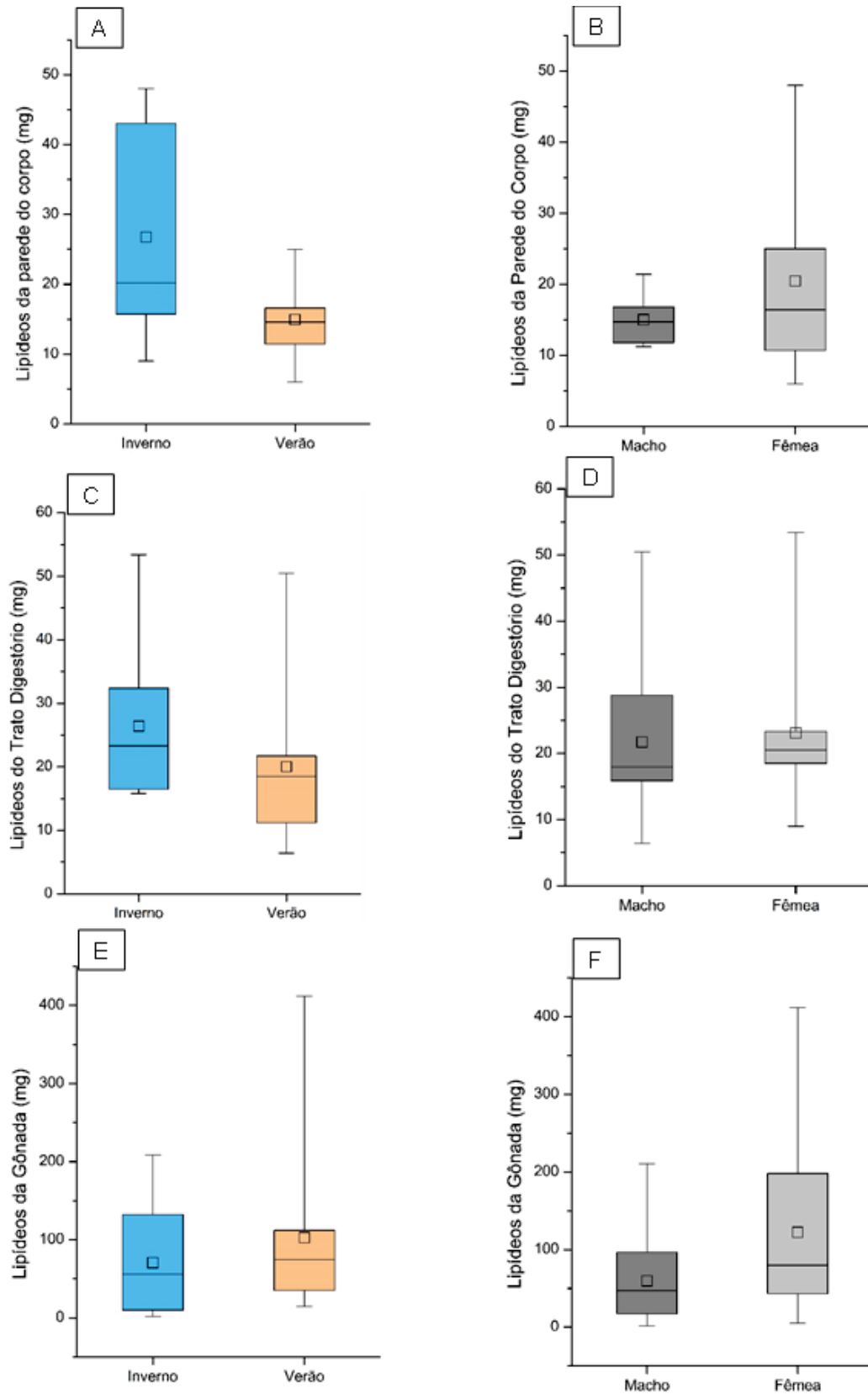


FONTE: O autor (2023)

5.4 LIPÍDEOS TOTAIS

As médias de lipídeos no inverno para a parede do corpo, trato digestório e gônada foram, respectivamente, 23.9 ± 13.9 mg, 26.4 ± 11.1 mg e 70.4 ± 69 mg e no verão, 14.9 ± 4.85 mg, 20 ± 11 mg e 102.7 ± 100.2 mg (figura 6 A, C e E). Houve diferença significativa (p 0.0122) apenas para a parede do corpo. Em relação ao sexo, os machos e as fêmeas apresentaram médias de, respectivamente, 15 ± 3 mg e 20.45 ± 12.65 mg para a parede do corpo, 21.45 ± 13.1 mg e 23.88 ± 12.84 mg para o trato digestório e 55.75 ± 54.8 mg e 122.3 ± 108.4 mg para a gônada (figura 6 B, D e F). Apenas esta última apresentou diferença significativa (p 0.0376). Destaca-se ainda, que as fêmeas do inverno apresentaram diferença significativa nas gônadas em relação aos machos (p 0.0344, ΔM 84.48 ± 33.9 mg).

FIGURA 6. Lipídeos presentes na parede do corpo (A-B), trato digestório (C-D) e gônada (E-F) de *H. grisea* no inverno e verão e em macho e fêmea.



FONTE: O autor (2023)

5.5 HISTOLOGIA, ANÁLISE DE CORES E LIPÍDEOS DAS GÔNADAS

As análises histológicas demonstraram que dos 12 organismos coletados no inverno, 7 foram machos e 5 fêmeas e dos 20 coletados no verão, 10 foram machos e 10 fêmeas. Na figura 7 está representado quatro cortes histológicos de fêmeas (A,B, E e G), de machos (C, D, F e H) e os estágios reprodutivos: I - proliferação, II – em maturação, III - maturação máxima e IV - emissão (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2022). As gônadas *in natura* desses organismos estão exemplificadas nas figuras 8 e 9.

FIGURA 7. Cortes histológicos utilizados para a sexagem e identificação do estágio da gametogênese em *H (H) grisea*: Proliferação (B e D); Em maturação (A e F); Maturação máxima (C e E), Emissão (G e H). As imagens A – D foram destaca os componentes celulares. Abreviações: Ov, ovócitos; EG, epitélio germinal; L, lúmen; SPZ, espermatozoide.

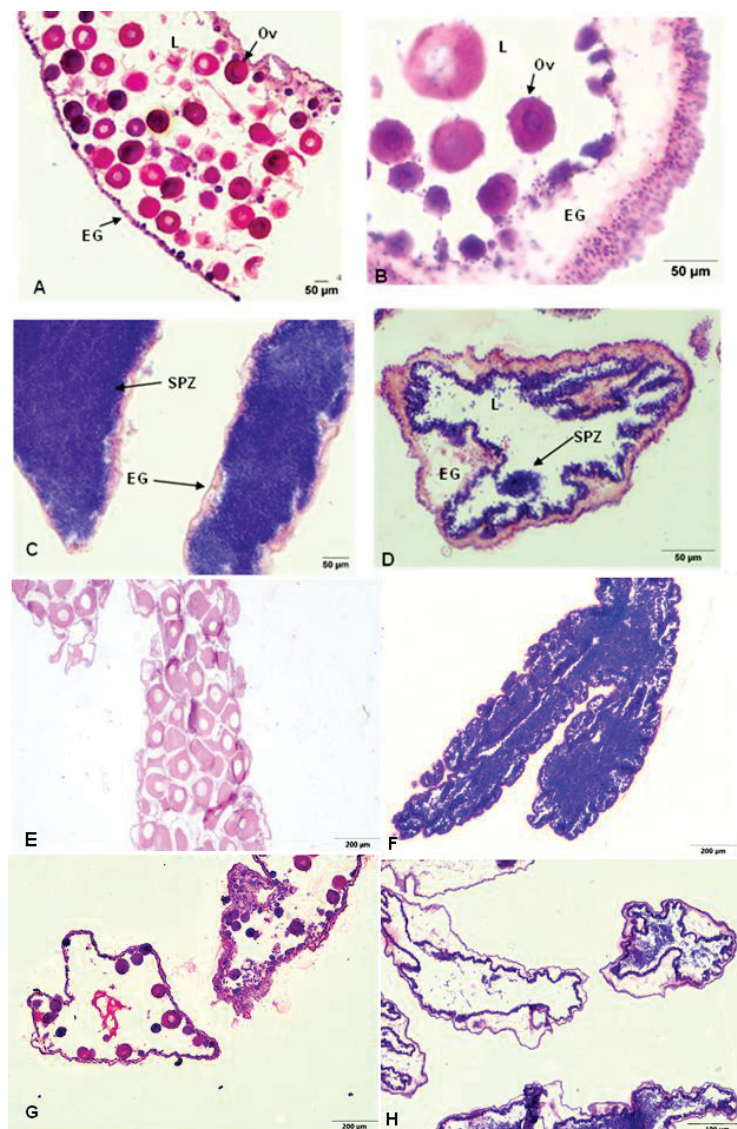
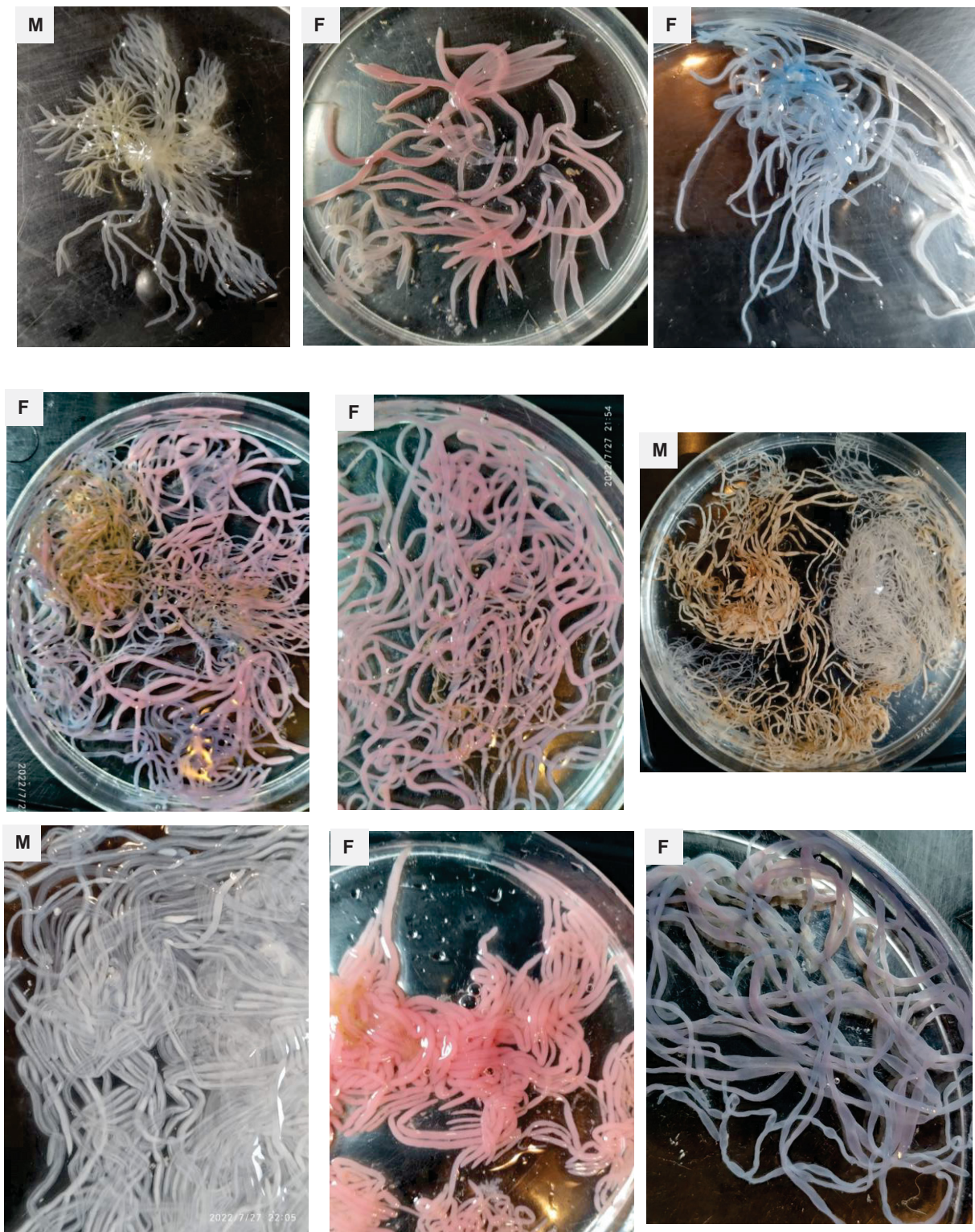
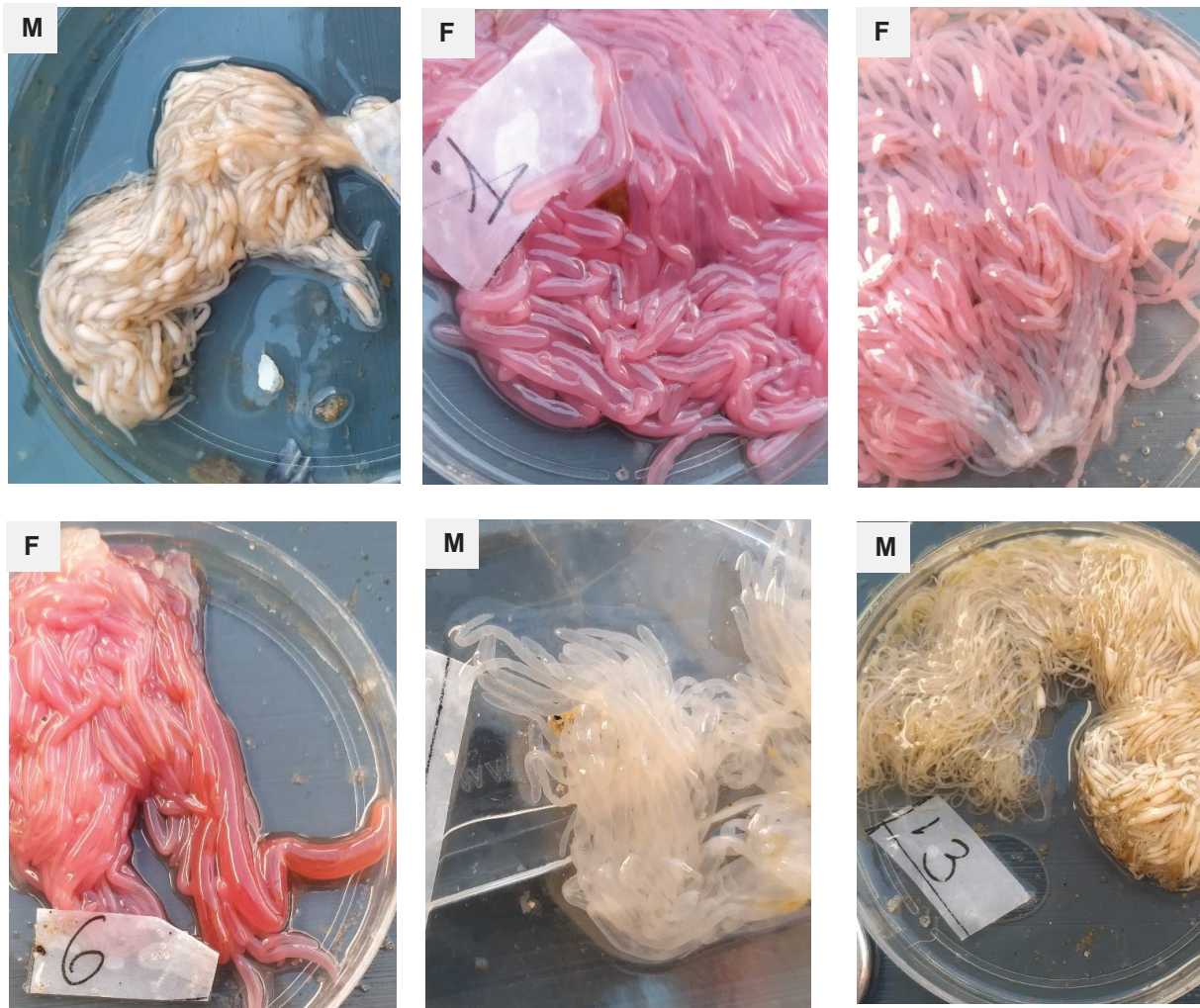


FIGURA 8. Exemplos de gônadas de machos (M) e fêmeas (F) de *H (H) grisea* no inverno.



FONTE: O autor (2023)

FIGURA 9. Exemplos de gônadas de machos (M) e fêmeas (F) de *H (H) grisea* no verão.

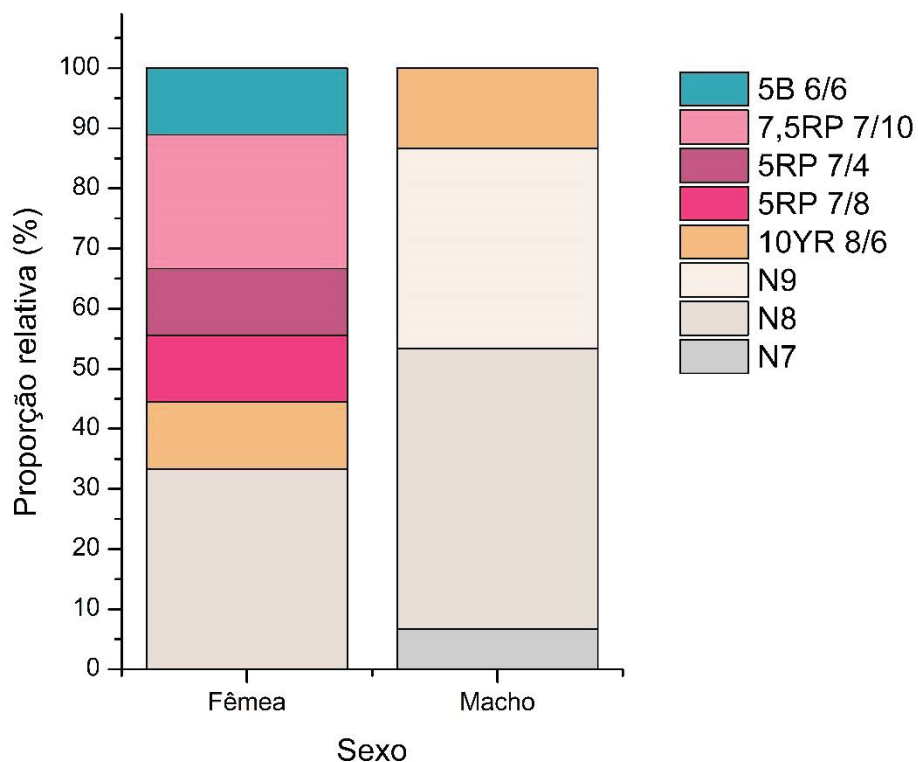


FONTE: O autor (2023)

As cores presentes nas gônadas de machos (M) e fêmeas (F) do inverno foram identificadas de acordo com a escala de Munsell (figura 10). As fêmeas apresentaram maior variabilidade de cores. A relação entre variabilidade de cores e estágio reprodutivo é apresentada na figura 11. Entre os machos predominam as cores neutras (N7, N8 e N9) independente do estágio, enquanto que nas fêmeas há uma variabilidade das cores e predomínio nos estágios III e IV.

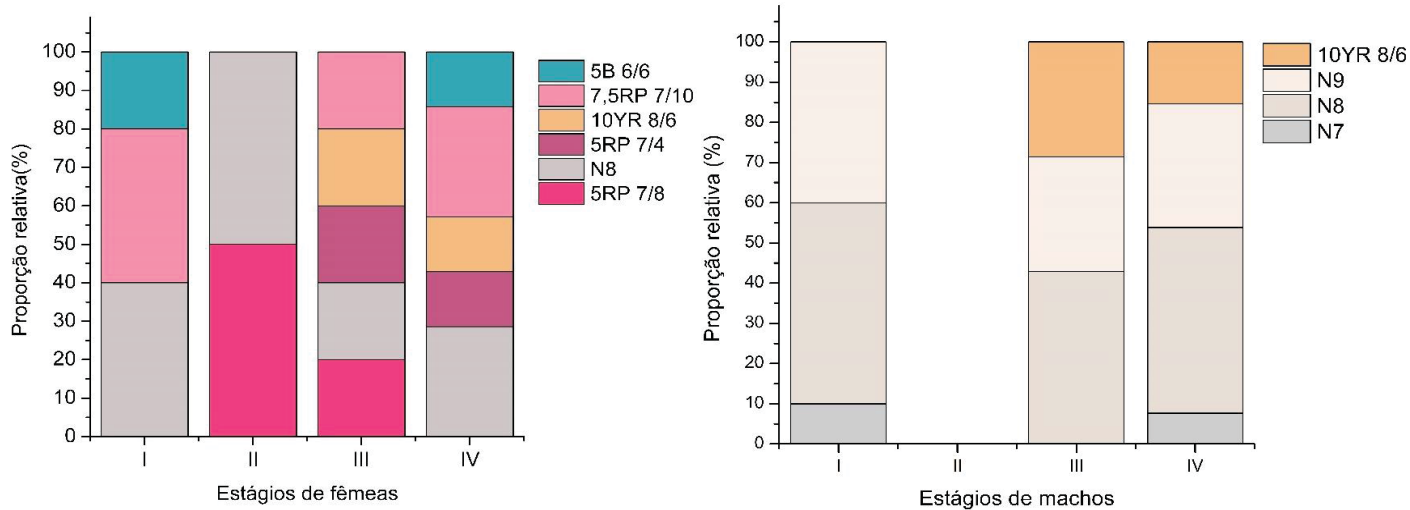
A observação do padrão de cores e dos estágios reprodutivos associados aos lipídeos presentes nas gônadas, indicam que em estágios de maior desenvolvimento gamético (III e IV) há uma maior quantidade de lipídeos e maior diversidade de cores em ambos os sexos para os organismos do inverno (figura 12). As fêmeas apresentaram mais lipídeos do que os machos em todos os estágios.

FIGURA 10. Proporção relativa das cores presente nas gônadas de fêmeas e machos de *H (H) grisea* no inverno. As notações N7, N8, N9, 10YR 8/6, 5RP 7/8, 5RP 7/4, 10YR 8/6, 7,5RP 7/10 e 5B 6/6 correspondem ao sistema de identificação de cores de Munsell. As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.



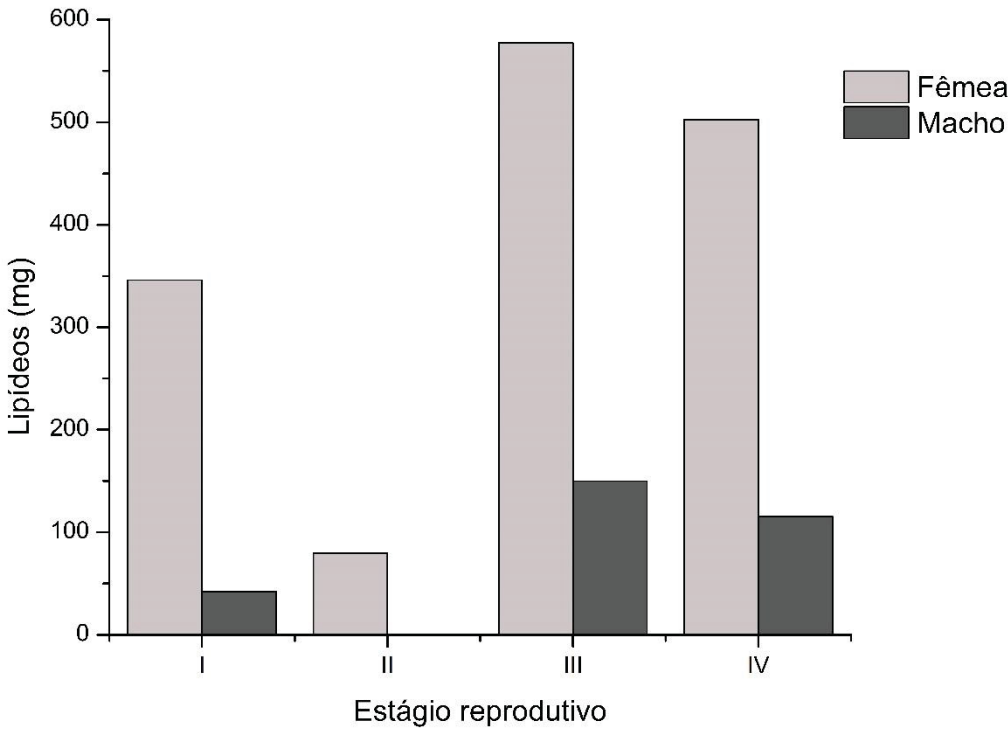
FONTE: O autor (2023)

FIGURA 11. Variabilidade de cores de acordo com o estágio reprodutivo dos organismos coletados no inverno. A esquerda é representada o estágio das fêmeas e a direita dos machos. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2022). As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.



FONTE: O autor (2023)

FIGURA 12. Relação entre os estágios reprodutivos identificados em machos e fêmeas de *H. (H) grisea* do inverno e lipídeos das gônadas. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2022).

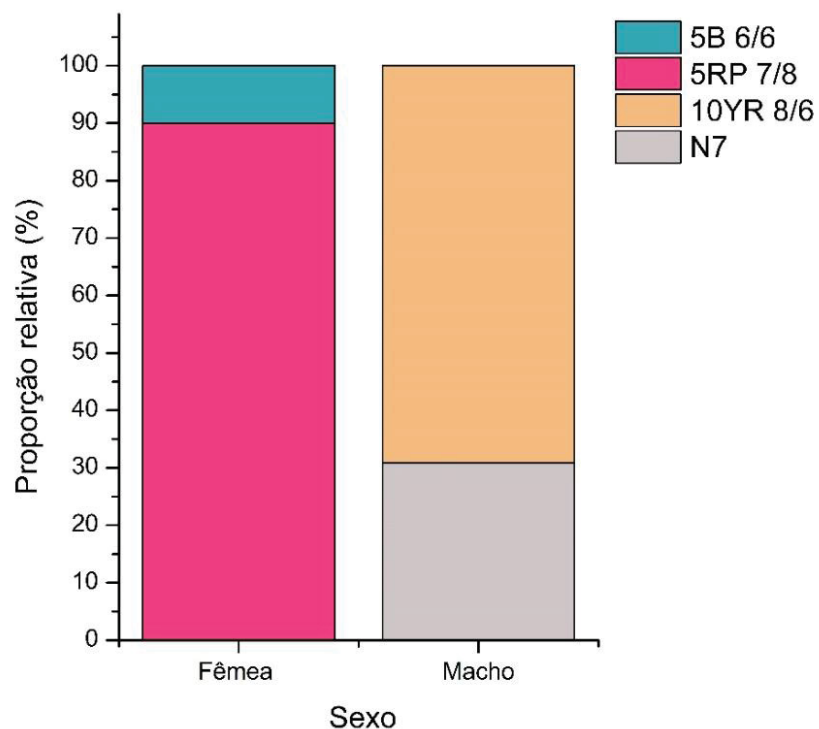


FONTE: O autor (2023)

As cores presentes nas gônadas de machos (M) e fêmeas (F) do verão foram identificadas, respectivamente, por N7 e 10YR 8/6 e 5RP 7/8 e 5B 6/6 (figura 13). A variabilidade das cores foi reduzida em relação ao inverno e os organismos apresentaram apenas dois padrões de cores.

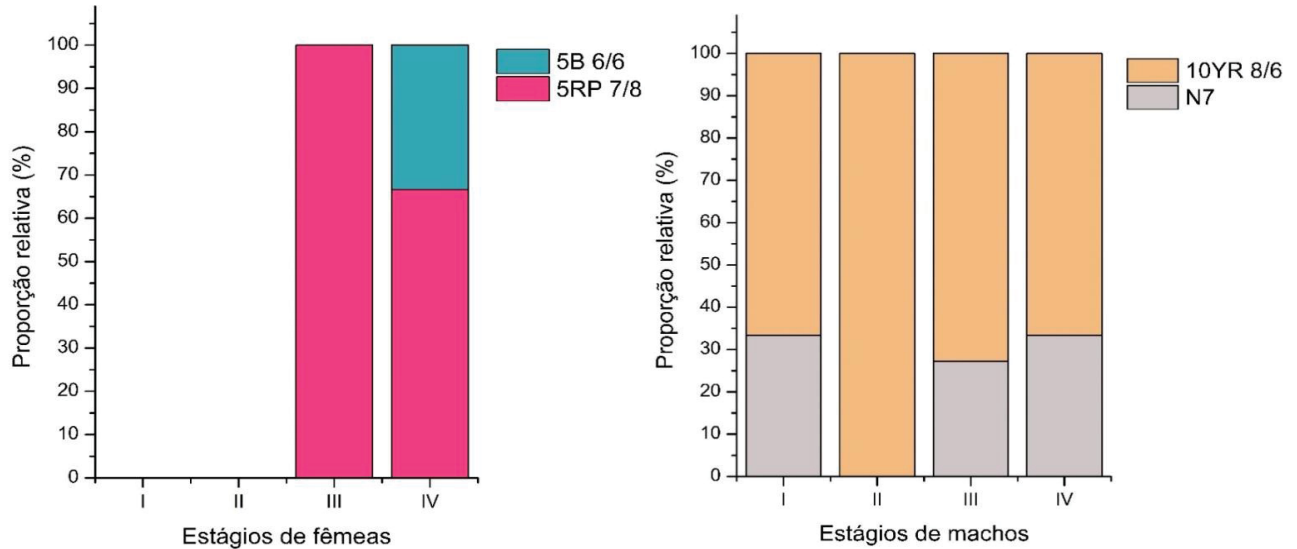
Os estágios reprodutivos identificados em machos foram I, II, III e/ou IV, enquanto que para as fêmeas foram os estágios III e/ou IV (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2022). A relação entre variabilidade de cores e estágio reprodutivo é apresentada na figura 14. Entre os machos ocorre a cor neutra (N7) nos estágios I, III e IV e a cor 10YR 8/6 independente do estágio. Nas fêmeas ocorre a cor 5RP 7/8 independente do estágio e a cor 5B 6/6 apenas no estágio IV. A relação entre o grau de desenvolvimento gamético e a maior quantidade de lipídeos também é observada no verão (figura 15).

Figura 13. Proporção relativa das cores presente nas gônadas de fêmeas e machos de *H (H) grisea* no verão. As notações N7, 10YR 8/6, 5RP 7/8 e 5B 6/6 correspondem ao sistema de identificação de cores de Munsell. As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.



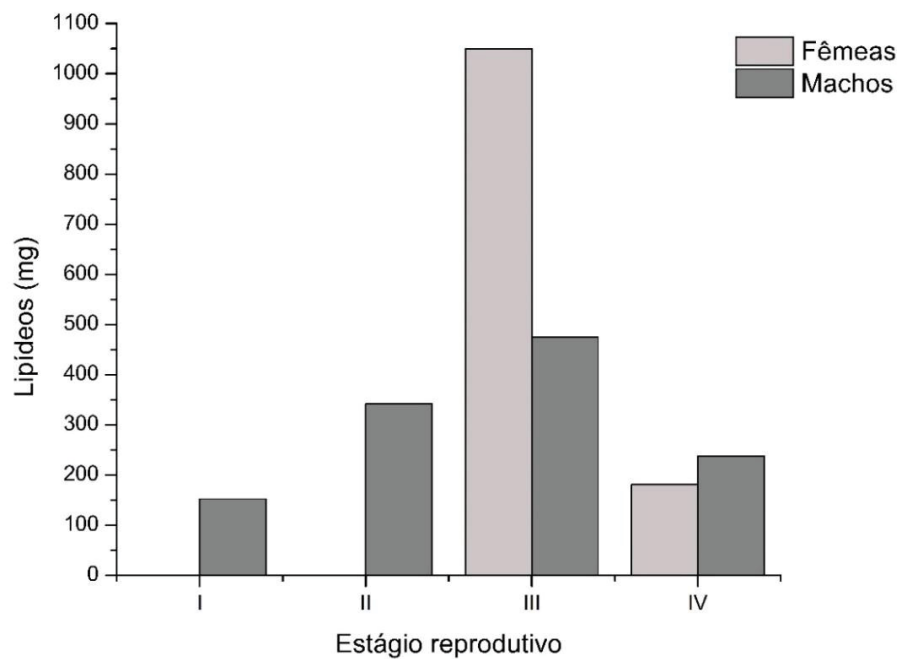
FONTE: O autor (2023)

FIGURA 14. Variabilidade de cores de acordo com o estágio reprodutivo dos organismos coletados no verão. A esquerda é representada o estágio das fêmeas e a direita dos machos.
Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2022). As cores na figura são aproximadas com as fornecidas na escala de Munsell.



FONTE: O autor (2023)

FIGURA 15. Relação entre os estágios reprodutivos identificados em machos e fêmeas de *H. (H) grisea* do verão e lipídeos das gônadas. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2022).

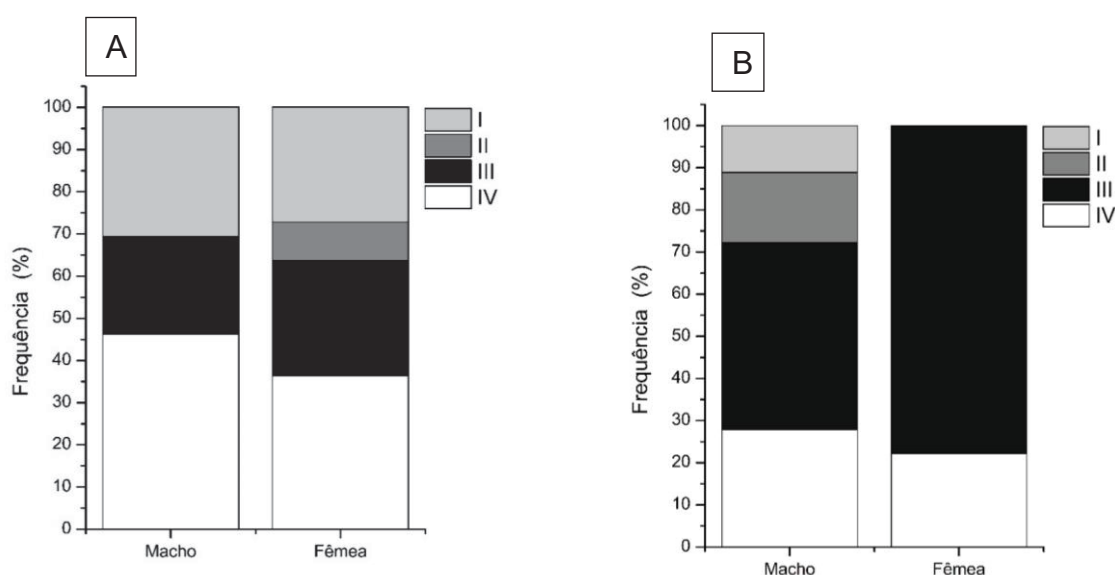


FONTE: O autor (2023)

A distribuição de frequência dos diferentes estágios de maturidade de machos e fêmeas de *H (H) grisea* no inverno e no verão está apresentada na figura 16. No inverno predominaram, em ambos os sexos, os estágios de proliferação e emissão, enquanto que no verão, apenas o estágio de maturação máxima.

Figura 16. Frequência dos diferentes estágios de maturidade para machos e fêmeas de *H (H) grisea*. Estágios: I – Proliferação, II - Em maturação, III – Maturação máxima e IV – Emissão (BUENO *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2022).

(a) Inverno; (b) verão.

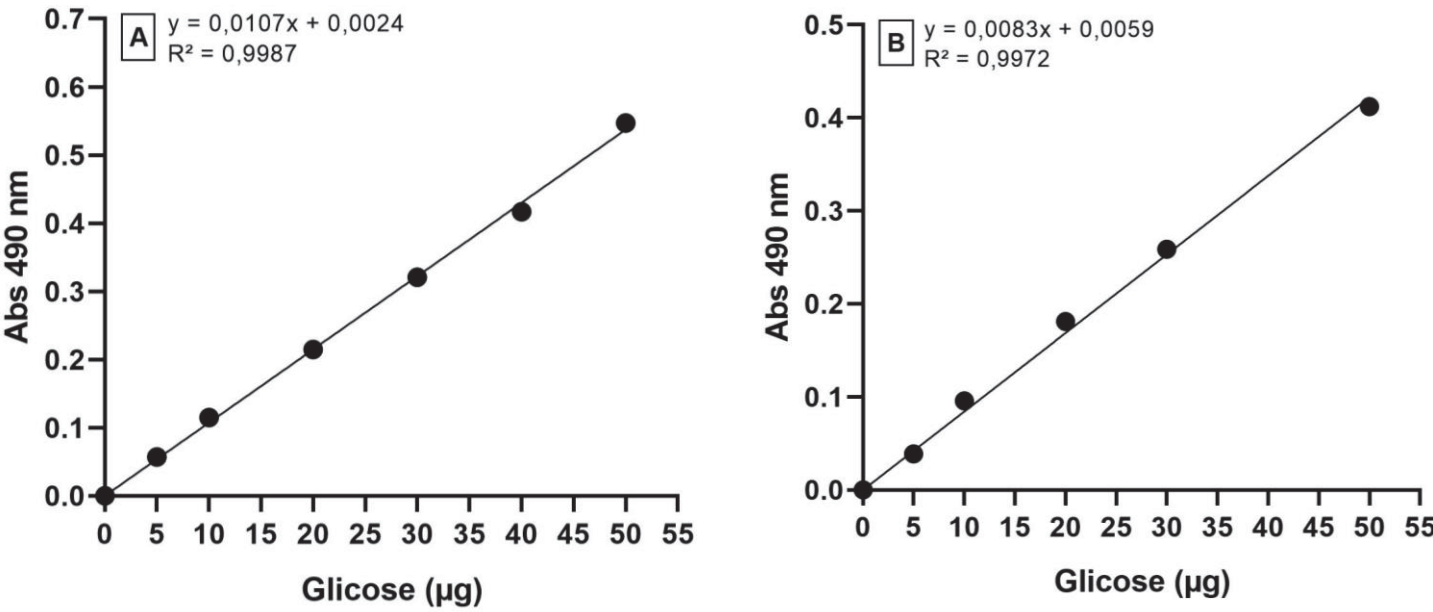


FONTE: O autor (2023)

5.6 CARBOIDRATOS TOTAIS

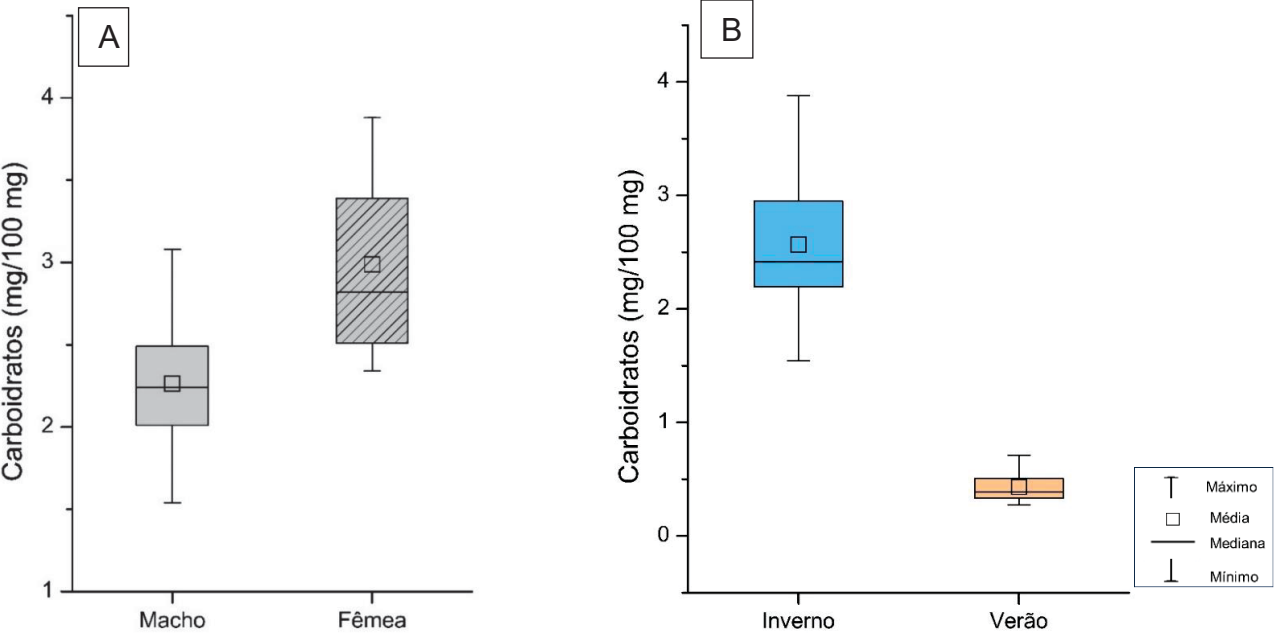
As curvas de calibração da glicose estão apresentadas na figura 17. A figura 18 apresenta a massa de carboidratos totais em 100 mg de tecido. No inverno, a cada 100 mg de parede do corpo há em média 2.57 ± 0.63 mg de carboidratos, com diferença significativa entre os sexos ($p = 0.046$, $\Delta M = 0.72 \pm 0.31$ mg a mais para as fêmeas). No verão houve em média 0.43 ± 0.12 mg de carboidrato e não houve diferença entre os sexos ($p = 0.476$). Entre as estações inverno e verão, os indivíduos apresentaram diferença significativa ($p < 0.000$, $\Delta M = 2.13 \pm 0.14$ mg a mais para o inverno).

FIGURA 17. Curvas de calibração de glicose.
(a) Verão; (b) Inverno.



FONTE:O autor (2023)

Figura 18. Massa de carboidratos em 100 mg da parede do corpo de *H (H) grisea* em machos e fêmeas do inverno (A) e entre as estações inverno e verão (B).

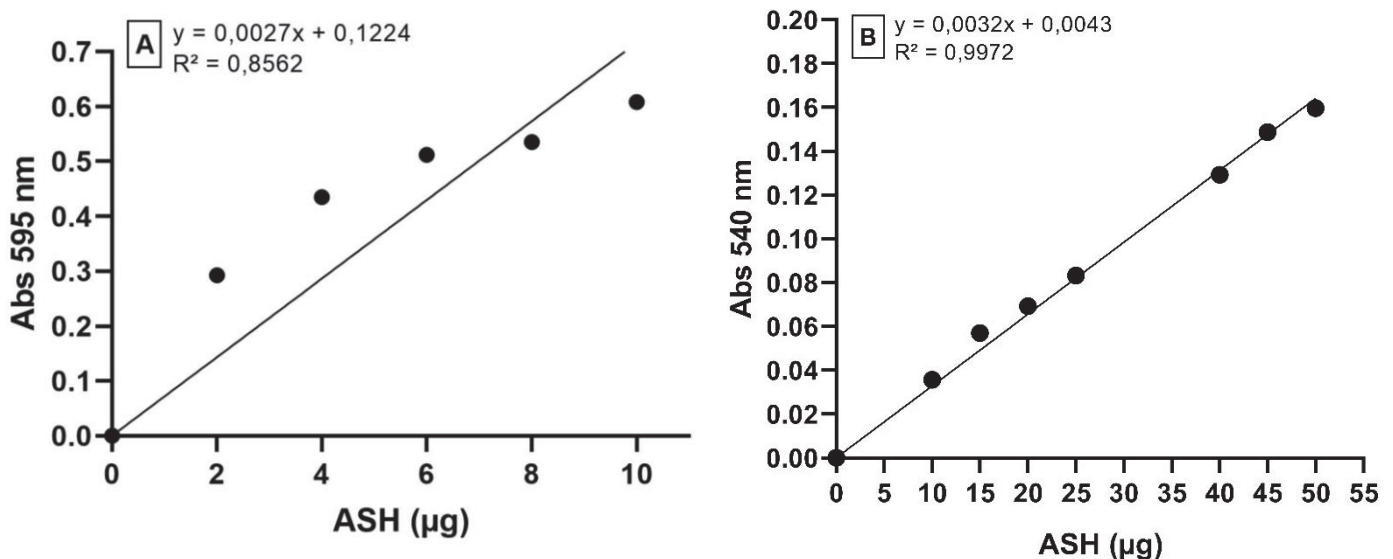


FONTE: O autor (2023)

5.7 PROTEÍNAS SOLÚVEIS

As curvas de calibração com ASH para o método de Bradford e de Biureto estão apresentadas na figura 19. A comparação entre os métodos resultou em diferença significativa tanto para as amostras do inverno (p 0.039, ΔM $2,16 \pm 0,98$ a mais para o Biureto), quanto para as do verão ($p < 0.000$, ΔM $5,34 \pm 0,79$ a mais para o Biureto) (figura 20). Contudo, devido o coeficiente de determinação (R^2) da curva de calibração do método do Biureto ser maior que a do método de Bradford e, portanto, explicar melhor a variabilidade dos dados, foi adotado esse método para as análises estatísticas das amostras.

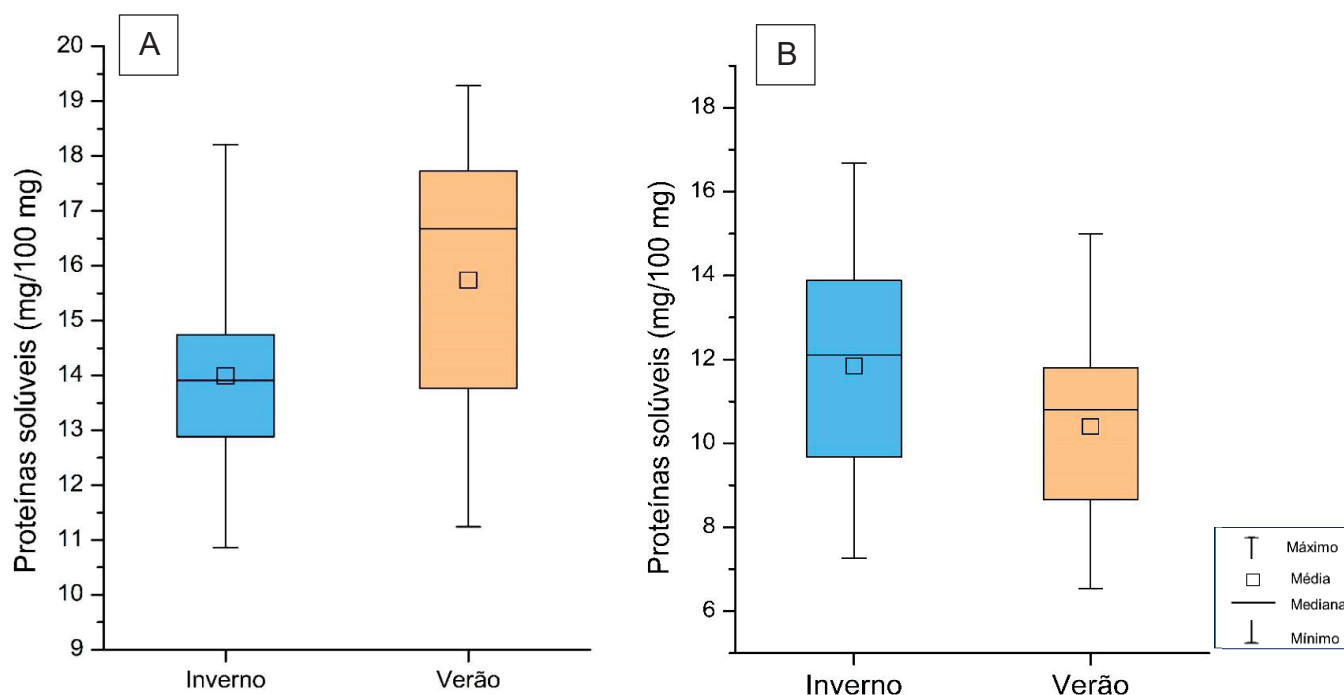
FIGURA 19. Curva de calibração de albumina sérica humana em 3,5 % NaCl.
(A) Método de Bradford; (B) Método do Biureto.



FONTE: O autor (2023)

A figura 20 apresenta a massa de proteínas solúveis encontradas em 100 mg de parede do corpo de *H (H) grisea* com média de 14 mg no inverno e 15,7 mg no verão. Não há diferença significativa entre os indivíduos do inverno (p 0.577), do verão (p 0.809) ou entre os indivíduos das duas estações (p 0.054).

Figura 20. Quantidade de proteínas solúveis em 100 mg da parede do corpo de espécimes de *H (H) grisea* nas estações inverno e verão. (A) Método de Biureto; (B) Método de Bradford



FONTE: O autor (2023)

5.8 COMPOSIÇÃO RELATIVA DE ÁCIDOS GRAXOS

A tabela 2 apresenta a composição de ácidos graxos em percentagem, da parede do corpo, gônada e trato digestório de machos e fêmeas de *H (H) grisea* coletados no inverno e a tabela 3 dos organismos coletados no verão. O cromatograma de uma das amostras pode ser visto no anexo 1. Foram identificados 30 ácidos graxos no inverno, sendo que os de proporção $\geq 5\%$ foram: C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C20:0, C20:1, C20:3, C20:4, C22:0, C23:1 e C24:1. Os ácidos graxos em maior quantidade na parede do corpo, gônada e trato digestório de machos foram os C18:0 e C20:1, enquanto que nas fêmeas foram C16:0, C18:0 e C20:4. O Heptadecenóico (C17:1) e Nonadecenóico (C19:1) estão ausentes nas gônadas e trato digestório de ambos os sexos.

No verão foram identificados 32 ácidos graxos, sendo os de proporção $\geq 5\%$: C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C19:0, C20:1, C20:3, C20:4, C23:1 e C24:1 em todos ou em alguns tecidos. Os que apresentaram maior quantidade foram os C16:0, C18:0 e C20:4. A depender do tecido alguns ácidos graxos podem estar em quantidade insignificante ou ausente, como os C16:2, C21:1, C22:5, C22:6, C23:1,

C24:0 e C24:1. Em contraste com o inverno, o C17:1 é encontrado nas gônadas de ambos os sexos, mas continua ausente no trato digestório. O C19:1 não foi observado nos organismos do verão. Apareceram dois ácidos graxos novos, o C22:5 e o C22:6. O marcador quimiotaxonômico, C23:1, foi identificado nos organismos do verão e do inverno.

Em relação as categorias de ácidos graxos, os saturados representam em média 41%, os monoinsaturados 40% e os poliinsaturados 18,7% nas duas populações (figura 21). Há um aumento de monoinsaturados nos organismos do inverno na parede do corpo e nas gônadas e de poliinsaturados no trato digestório de fêmeas. Nos machos, as oscilações são mais sutis em relação aos poliinsaturados nas gônadas e trato digestório. A análise estatística pela ANOVA resultou em não significativo ($p = 0.675$) para os indivíduos entre sexo e/ou entre estação. Não foram analisadas variações entre cada ácido graxo por tecido, estação sexo.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos (%) da parede do corpo (P), gônada (G) e trato digestório (TG) de *H (H) grisea* no inverno.

Ácido graxo	Tempo de retenção (min)	Macho			Fêmea		
		P (n=7)	G (n=6)	TG (n=6)	P (n = 5)	G (n = 5)	TG (n = 4)
C 14:0	18.46	1.9	1.8	2.8	1.1	3.9	2.5
C 15:0	19.81	1.4	1.0	1.7	1.0	3.2	1.7
C 15:0	20.00	0.4	0.4	0.6	0.3	2.5	0.5
C 15:0	20.61	0.9	0.9	1.3	0.7	2.3	1.1
C 16:1	22.20	2.2	2.7	2.9	2.1	5.8	3.5
C 16:2	22.25	0.1	0.4	1.1	0.3	0.5	0.2
C 16:0	22.63	7.4	9.0	8.5	6.6	15.8	8.1
C 17:1	23.66	0.4	0.3	0.0	0.5	0.4	0.0
C 17:0	23.86	1.2	1.5	1.7	1.0	2.5	1.8
C 17:0	24.61	0.7	1.7	0.9	2.2	2.1	1.4
C 18:1	25.96	5.5	4.5	4.1	4.2	6.2	4.4
C 18:1	26.10	3.6	5.5	4.8	3.8	5.6	5.0
C 18:0	26.46	7.6	12.2	10.3	7.3	12.2	10.4
C 19:1	27.75	2.2	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0
C 19:0	28.25	2.0	3.0	3.9	1.8	2.3	3.8
C 20:4n-6	28.78	11.5	11.1	6.2	14.4	8.3	5.1
C 20:3	28.92	5.6	11.2	6.0	6.9	10.1	4.8
C 20:1	29.49	14.0	6.9	7.4	13.0	5.6	9.1
C 20:1	29.67	0.0	2.8	2.5	0.0	2.2	2.7
C 20:0	29.97	3.6	5.2	5.4	3.7	4.9	5.2
C 21:1	31.34	1.1	2.2	2.5	0.7	2.4	2.8
C 21:0	31.62	3.0	2.0	3.6	3.2	2.9	3.6
C 22:1	32.93	3.0	2.7	4.3	3.1	3.7	4.8
C 22:0	33.22	4.7	2.9	4.9	4.6	4.5	5.3
C 23:1	34.38	5.4	1.7	3.1	5.2	1.8	2.9
C 23:1	34.51	0.9	0.4	0.9	1.0	0.6	1.2
C 23:0	34.75	2.2	1.0	1.9	2.2	1.5	2.0
C 24:1	35.88	6.1	4.4	5.3	6.2	4.2	4.8
C 24:1	36.01	0.3	0.2	0.5	0.4	1.1	0.6
C 24:0	36.22	1.0	0.5	0.9	0.9	1.1	0.9
Saturados		38.0	43.1	48.2	36.6	51.6	48.1
Monoinsaturados		44.7	34.2	38.5	41.8	33.0	41.8
Poliinsaturados		17.3	22.8	13.3	21.6	15.4	10.1

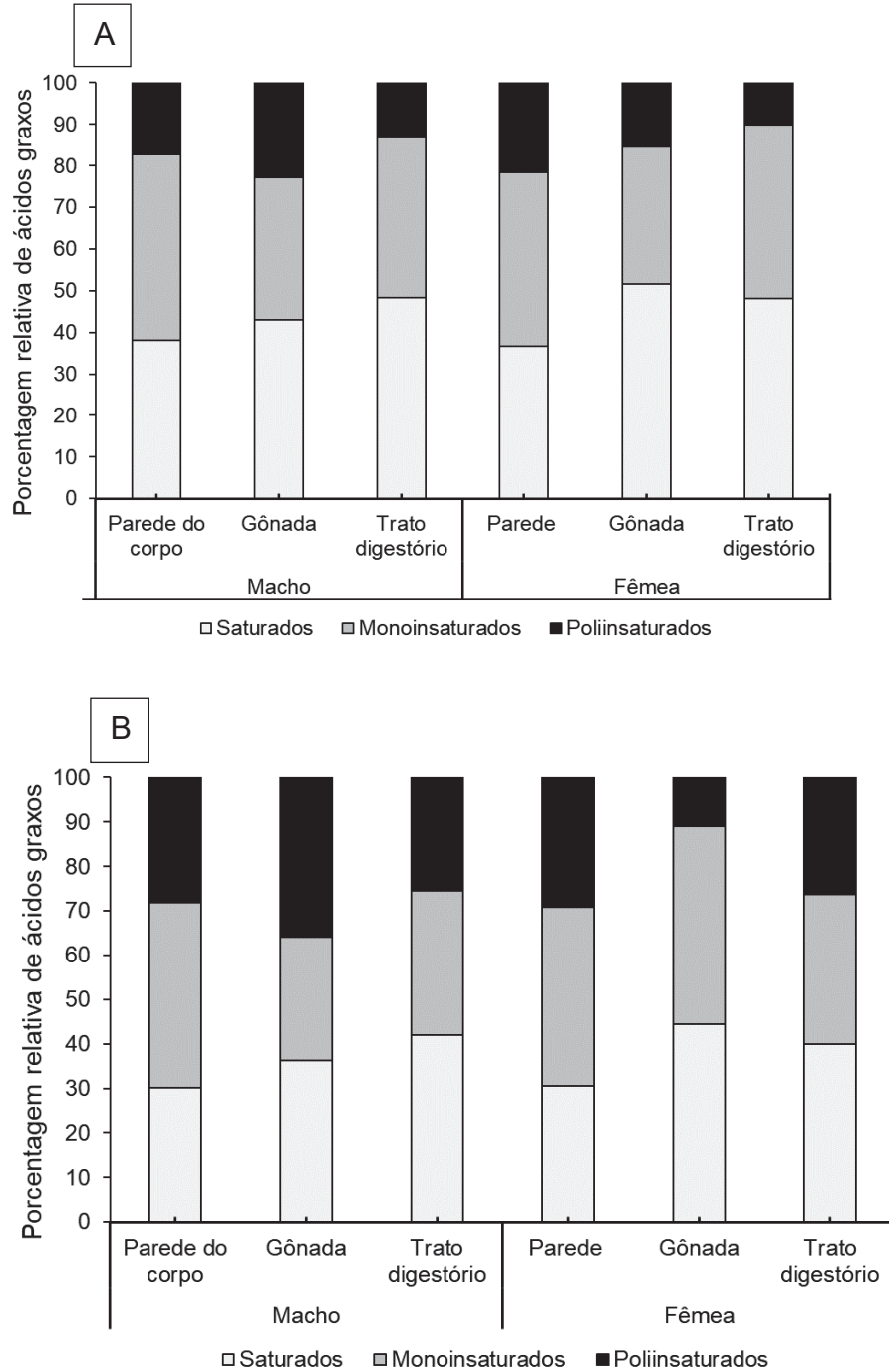
FONTE: O autor (2023)

Tabela 3. Composição de ácidos graxos (%) da parede do corpo (P), gônada (G) e trato digestório (TG) de *H. (H) grisea* no verão.

Ácido graxo	Tempo de retenção (min)	Macho			Fêmea		
		P (n=10)	G (n=7)	TG (n=10)	P (n=10)	G (n=10)	TG (n=10)
C14:0	18.49	1.6	0.6	2.2	1.6	3.8	2.3
C 15:0	19.84	1.3	0.3	1.6	1.2	3.3	1.5
C 15:0	20.00	0.2	0.0	0.4	0.5	1.2	0.5
C 15:0	20.61	0.4	0.1	0.9	0.3	1.7	1.0
C 16:1	22.20	2.2	2.0	3.8	2.8	5.9	3.9
C 16:2	22.28	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.1
C 16:0	22.63	6.8	4.4	9.3	6.5	12.3	9.2
C 17:1	23.69	0.6	0.4	0.0	0.3	1.7	0.0
C 17:0	23.86	0.9	0.4	1.4	0.8	0.0	1.4
C 17:0	24.58	0.8	0.9	1.6	0.6	2.0	1.4
C 18:1	26.07	3.7	4.2	3.7	3.5	1.3	3.5
C 18:1	26.11	3.0	5.3	4.0	2.9	7.2	4.1
C18:0	26.46	5.7	17.2	10.4	6.4	5.7	9.8
C19:1	27.75	1.3	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0
C19:0	28.25	1.6	3.5	2.9	1.6	9.0	2.6
C 20:4n-6	28.77	20.0	16.8	12.1	21.0	2.6	12.2
C 20:3	28.89	8.1	19.2	9.4	8.3	7.6	9.9
C 20:1	29.49	16.1	7.8	8.5	0.0	10.6	8.8
C 20:1	29.67	0.0	2.4	1.2	15.0	6.4	1.2
C 20:0	29.75	2.9	4.3	3.9	3.0	1.7	3.7
C 21: 1	31.18	0.0	0.7	2.4	0.0	2.8	2.1
C 21:0	31.66	2.9	1.7	2.5	2.9	1.2	2.4
C22:5	31.85	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	1.4
C22:6	31.96	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	2.7
C22:1	32.96	2.7	1.7	2.7	2.7	1.7	4.2
C 22:0	33.20	3.5	2.1	3.2	3.5	1.9	3.1
C 23:1	34.36	5.7	1.4	2.7	5.5	2.7	2.4
C 23:1	34.51	0.9	0.0	0.7	0.8	1.6	0.7
C 23:0	34.77	1.6	0.8	1.1	1.6	0.3	1.0
C24:1	35.88	5.7	1.8	3.0	5.3	0.6	2.7
C24:1	36.01	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
C 24:0	36.12	0.0	0.0	0.3	0.0	0.2	0.2
Saturados		30.1	36.3	41.9	30.5	44.4	39.9
Monoinsaturados		41.8	27.7	32.7	40.3	44.6	33.7
Poliinsaturados		28.1	36.1	25.4	29.3	11.0	26.4

FONTE: O autor (2023)

Figura 21. Porcentagem relativa das classes de ácidos graxos por tecido de *H (H) grisea* coletada no inverno (a) e no verão (b)



FONTE: O autor (2023)

5.9 ÍNDICE DE QUALIDADE NUTRICIONAL DE LIPÍDEOS

A parede do corpo dos machos do inverno/verão apresentou os seguintes índices $IA = 0.24/0.19$, $IT = 0.37/0.25$ e $h/H = 2.21/3.21$ e as fêmeas, respectivamente, $IA = 0.18/0.23$, $IT = 0.30/0.26$ e $h/H = 2.90/3.42$.

6 DISCUSSÃO

6.1 BIOMETRIA E TEOR HÍDRICO

O peso corporal úmido dos indivíduos da Praia de Guaratuba apresentou-se superior aos encontrados em outros estudos com *H (H) grisea*. A literatura descreve variação entre 24 g e 195 g (COSTA, 2010; DIAS, 2012; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016; PEREIRA, 2017), enquanto que neste estudo foi entre 62 g e 306 g. Dentre os fatores que podem explicar esses resultados estão o teor hídrico e o conteúdo do trato digestório. Em *H (H) grisea*, o teor hídrico da parede do corpo correspondeu a 85% do peso úmido total, não apresentando diferença entre os sexos e estações. Ponte (2017) relata um teor hídrico de 79,4% em relação peso total. Em geral, a porcentagem de água na parede do corpo corresponde de 65-90% (BINYON, 1972; TAKEMAE; NAKAYA; MOTOKAWA, 2009)

Essa grande porcentagem de água associada ao peso reduzido após secagem, pode ser uma condição agravante para a utilização dessa espécie como recurso pesqueiro, pois duas etapas do processamento primário consistem em ferver e secar ao sol ou no fogo (CONAND, 1989; PURCELL, 2014), o que ocasiona grande redução no peso, alteração na textura e aparência e menor biomassa para consumo (ZHANG *et al.*, 2017). Em *Stichopus japonicus*, a perda de peso após fervura pode chegar a 93%, representando uma redução de 3 a 4 vezes o peso inicial (ZHANG *et al.*, 2021). Esse parâmetro juntamente com o tamanho e a composição bioquímica determinam o preço de venda (PURCELL, 2010; ZMEMLIA *et al.*, 2020). Espécies relevantes no comércio mundial pesam mais de 1 kg, como *Holothuria fuscogilva* e *Cucumaria japonica* que chegam a 2.4 kg e 1.5 kg, respectivamente (KINCH *et al.*, 2008; PURCELL *et al.*, 2016).

De outro modo, a presença de água nos tecidos e do fluido celômico desempenham um papel importante na pressão osmótica e na osmolalidade. As holotúrias possuem baixa capacidade de regular íons e se comportam como organismos isosmóticos com o meio (BINYON, 1972; GENG *et al.*, 2016). Isso resulta em um esforço constante para manter as funções enzimáticas intracelulares

estáveis, regular o metabolismo e controlar a pressão osmótica (BINYON, 1972; MENG *et al.*, 2011). Duas estratégias que são utilizadas para manter a homeostase são a excreção de compostos orgânicos (aminoácidos, lipídeos e açúcares redutores) e água dos tecidos para o fluido celômico (BINYON, 1972; MENG *et al.*, 2011).

Vidolin, Santos-Gouvea e Freire (2002) apresentam que *H (H) grisea* possuem algum tipo de mecanismo osmorregulador que reduz a permeabilidade osmótica da parede do corpo evitando a perda/entrada de água em situações de variação de salinidade ou exposição ao ar. Stickle e Ahokas (1973) apontaram que a variação na salinidade parece não afetar significativamente o conteúdo de água da parede do corpo em *Cucumaria miniata*. Tamori, Takemae e Motokawa (2010) observaram que em meio hiperosmótico com sacarose, a derme de *Actinopyga mauritiana* exsuda água e enrijecimento fortemente.

Em concordância aos resultados obtidos, a variação de salinidade *in situ*, não demonstrou efeito aparente do conteúdo de água da parede do corpo e das gônadas, levando a crer a existência de algum mecanismo de regulação osmótica tecidual e reafirmando o papel da água na homeostase (SVETASHEV *et al.*, 1991).

O índice gonadal de *H (H) grisea* foi menor no inverno e este era um padrão esperado. O estágio reprodutivo na Praia de Guaratuba é caracterizado, majoritariamente, como pós-desova nessa estação (Bueno *et al.*, 2015). Assim, as gônadas estão pequenas e/ou vazias de gametas, justificando o peso reduzido. No verão, essa espécie encontra-se no máximo de desenvolvimento gonadal para a reprodução e as gônadas são mais pesadas.

Pereira (2017) destaca o peso de gônadas no verão entre 2,3 e 35,6 g para machos e 4,7 e 81,7 g para fêmeas de *H (H) grisea*. O mesmo padrão é observado em *Holothuria polii*, *Holothuria fuscogilva* e *Stichopus herrmani* (TEHRANIFARD *et al.*, 2006; MUTHIGA; KAWAKA, 2009; TOLON; ENGIN, 2019). As fêmeas podem possuir gônadas mais robustas que os machos por razões como: tamanho dos ovócitos (100-280 µm diâmetro), conteúdo lipídico (SETIAWATI *et al.*, 2021; VENÂNCIO *et al.*, 2022) e diferentes estágios reprodutivos em um ciclo assíncrono (FOGLIETTA *et al.*, 2004). Além disso, variações intra e interespecífica são possíveis, como por exemplo, em indivíduos maduros de *H. scabra* que variam entre 15 g a 315 g (RAMOFAFIA; BYRNE; BATTAGLENE, 2003; RASOLOFONIRINA *et*

al., 2007; RAHANTOKNAM, 2017) e *Athyonidium chilensis* que só atingem 35 g (PETERS-DIDIER *et al.*, 2018).

6.2 CONTEÚDO DO TRATO DIGESTÓRIO E MATÉRIA ORGÂNICA

O conteúdo do trato digestório está diretamente influenciado pela heterogeneidade do ambiente em que estão situados (FERGUSON, 1969; GRAHAM; THOMPSON, 2009; SLATER; CHEN, 2015). O local da coleta é conhecido por grande aporte de matéria orgânica oriundo dos sistemas terrestres, de sedimentos, oscilação das marés e batimento das ondas, bem como poluentes sintéticos despejado por turistas, banhistas e/ou trilheiros (ANTUN; BALDIN, 2013; BISHOP, 2015; PARANÁ, 2021).

Por consequência, durante o processamento do trato digestório dos organismos foi observado uma diversidade diversos fragmentos de rochas, conchas de bivalves, exoesqueleto de crustáceos, placas de bolachas-do mar, algas, areia e fragmentos de vidro. Essa diversidade de componentes indica que esses organismos não possuem uma preferência alimentar e que há um baixo grau de discriminação em relação a composição do sedimento. Graham e Thompson (2009) observaram que a *H (H) grisea* ingeriu mais peças do plástico PVC (policloreto de vinila) e linhas de *Nylon* do que outras espécies e esse comportamento não está associado com a ingestão de sedimento. Os dados obtidos reforçam a tese de que *H (H) grisea* não é seletiva no processo de ingestão do sedimento.

Uthicke e Karez (1999) observaram que as espécies *Holothuria atra*, *Holothuria edulis* e *Holothuria nobilis* apresentaram baixa seletividade entre sedimentos e entre dietas com diferentes valores nutricionais. O mesmo foi observado para *Holothuria fuscocinerea* (ROBERTS, 1979). A seletividade do sedimento, portanto, pode ocorrer a depender de fatores conjuntos como: tamanho e textura da superfície da partícula, dos processos mecânicos e morfologia dos tentáculos orais (TAGHON, 1989) e principalmente pela quantidade de matéria orgânica distribuída na área superficial das partículas (MAYER, 1989; TAGHON, 1989).

O tipo de alimento ingerido é uma importante informação ecológica porque possibilita delinear dietas artificiais e/ou naturais usadas na aquicultura para potencializar o crescimento somático e gonadal, melhorar a palatabilidade

(DWORJANYN; PIROZZI; LIU, 2007), entender as interações tróficas, estratégias de alimentação (HO; PENNING, 2008) e compreender o requerimento, mobilização e estocagem de biomoléculas para a sobrevivência e para reprodução (LOWE; LAWRENCE, 1976).

O teste de correlação de Pearson indicou que quanto o maior CTG seco, maior a quantidade de matéria orgânica, principalmente no inverno. Em *Holothuria hawaiiensis* do hemisfério norte, no final do outono os organismos apresentaram maior conteúdo no trato digestório e na estação seguinte, inverno, os maiores pesos corporais (DAR; AHMAND, 2006).

Em *Apostichopus japonicus*, o aumento da temperatura é uma condição limitante para o crescimento do animal e taxas de ingestão, que tem um *optimum* entre 10-20 °C (YANG *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2018). Gao *et al* (2009) observaram experimentalmente que em 14 °C os organismos aumentaram significativamente de tamanho em relação aos de 28 °C. Isso pode sugerir uma preparação para períodos mais frios utilizando como estratégia o aumento no consumo de sedimento e investimento dos recursos alimentares no desenvolvimento corporal. Esse fenômeno também ocorreu com os organismos deste estudo, que apresentaram maior peso corporal, CTG seco e matéria orgânica no inverno.

Esse padrão precede o período reprodutivo devido a necessidade de maior aporte de nutrientes para a produção dos gametas (WIEDMEYER, 1992; DAR; AHMAND, 2006). Portanto, a reprodução se caracteriza como um evento que requer grande investimento energético (THOMPSON, 1982; MARQUET *et al.*, 2017). Sugere-se então que a *H (H) grisea* aumente a taxa de alimentação e estoque nutrientes no inverno em ambos os sexos (HAMEL; MERCIER, 1996). Contudo, no presente estudo, os maiores CTG seco e matéria orgânica ocorreram no verão e apenas nas fêmeas. Confirmando que em algumas holotúrias, as fêmeas necessitam de mais nutrientes para investir na produção dos gametas (DAR; AHMAND, 2006; SANTOS *et al.*, 2016).

6.3 LIPÍDEOS TOTAIS

A baixa porcentagem de lipídeos da parede do corpo de *H (H) grisea*, foi semelhante ao encontrado por Aydin *et al.* (2011) em *H. polii*, *H. tubulosa* e *H. mammata*, Liu *et al.* (2017) em *Australostichopus mollis* e Roggatz *et al.* (2017) para *Parastichopus regalis*. Em relação a gônada e trato digestório, a quantidade de

lipídeos foi aproximadamente 35 vezes maior do que a registrada para *Australostichopus mollis* (LIU *et al.*, 2017).

Em *Stichopus japonicus*, os lipídeos da parede do corpo representam 0.6% e nas vísceras 1.3% (KASAI, 2003). O mesmo padrão de distribuição dos lipídeos foi observado por Svetashev *et al.* (1991) em 11 espécies de holotúrias e em *Cucumaria frondosa* (ZHONG; KHAN; SHAHIDI; 2007), sustentando a hipótese de que os órgãos internos são estruturas de reserva de nutrientes e a parede do corpo por ser constituída, principalmente, por tecido muscular e conjuntivo, é essencialmente proteica, como será discutido posteriormente.

A ausência de diferença significativa dos lipídeos na parede entre estações do ano também foi observada em *Cucumaria frondosa* e *H. tubulosa*, sugerindo certa homogeneidade no empenho da captação e estoque dos lipídeos ao longo dos meses (ABUZAYTOUN, 2017; KÜNILI; ÇOLAKOGLU, 2019). O mesmo foi observado para as gônadas de *H. (H) grisea*. Esse efeito pode ser explicado pela translocação do epitélio germinal para a produção gamética (HAMEL; MERCIER, 1996; BYRNE *et al.*, 1998), sendo relatada também para *H. scabra* (KRISHNAN, 1968), *Amperima rosea*, *Bathyplores natans* e *Laetmogone violacea* (HUDSON *et al.*, 2004).

Diante disso, os tecidos que se comportam como fornecedores de lipídeos são a parede do corpo e o trato digestório. O primeiro caracteriza-se por disponibilizar substrato para via de biossíntese (glicose, corpos cetônicos e aminoácidos) e o segundo fornecedor contínuo de lipídeos (KRISHNAN, 1968; HAMEL; MERCIER, 1996; KERSTEN, 2001). Em fêmeas de *H. scabra* foi observado que há uma diminuição dos lipídeos presente no trato digestório e aumento nas gônadas no estágio de maturação, alternando-se durante a emissão (KRISHNAN, 1968). Nesse estudo também é possível observar que no verão, as fêmeas apresentaram uma redução na quantidade de lipídeos do trato digestório, ainda que não seja estatisticamente diferente. Recomenda-se o aumento do esforço amostral para confirmar esse comportamento.

A elevada quantidade de lipídeos nas gônadas femininas no inverno, reitera a ideia de maior investimento na produção de gametas (DAVID *et al.*, 2023). O investimento materno é destinado para a qualidade e viabilidade da larva, enquanto que em machos o estoque energético dos espermatozoides é orientado para a

motilidade durante a fertilização (PROWSE; SEWELL; BYRNE, 2008; DAVID *et al.*, 2020).

Em relação aos aspectos comerciais, os níveis de lipídeos representam um dos critérios relevantes no momento da escolha e compra do pepino-do-mar (parede do corpo com musculatura). Por essa ser a parte mais consumida, o teor de gordura deve ser bem conhecido, pois determina algumas características físico-químicas como aroma, textura, aparência e viscosidade (KINCH *et al.*, 2008; HAMEL; MERCIER, 2008; OEDJOE, 2017).

As respostas sensoriais a essas características durante o seu preparo e mastigação (cremosidade e suavidade), influenciam diretamente a aceitabilidade, procura e consumo (DREWNOWSKI, 1992; APPLETON *et al.*, 2021). Assim, a ausência de gordura pode ser uma condição indesejável na escolha dos produtos. Vale ressaltar que o conteúdo de gordura dos pepinos-do-mar é inferior ao encontrado em outros pescados marinhos de alta comercialização, como caranguejos e peixes, sendo considerados apropriados para o consumo humano (WEN; HU; FAN, 2010; SROYRAYA *et al.*, 2017).

Os lipídeos também desempenham funções fisiológicas específicas nos pepinos-do-mar, como fonte energética e estrutural para o processo de regeneração, períodos de inanição prolongada e reparação tecidual (autólise), efeito antioxidante e defesa química (BORDBAR; ANWAR; SAARI, 2011; GAO; YANG, 2015; KHOTIMCHENKO, 2018).

6.4 HISTOLOGIA, ANÁLISE DE CORES E LIPÍDEOS DAS GÔNADAS

6.4.1 Histologia

Os estágios reprodutivos observados através da histologia das gônadas coincidem com os apresentados por Bueno *et al.* (2015) e Tavares *et al.* (2022). No período do inverno predominou o estágio proliferação e emissão e no verão maturação máxima e emissão. Esses dados reforçam o padrão reprodutivo da *H. (H) grisea* como contínuo e síncrono, além de sustentar o efeito do aumento da temperatura como indutor da produção máxima e emissão dos gametas. O mesmo é observado em *Athyonidium chilensis*, *Holothuria fuscocinerea*, *Holothuria arguinensis* e *Holothuria sanctori* (NAVARRO; GARCIA-SANZ; TUYA, 2012; BENÍTEZ-VILLALOBOS; AVILA-POVEDA; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, 2013; MARQUET *et al.*, 2017; PETERS-DIDIER *et al.*, 2018).

Também foi notado que o conjunto de túbulos gonadais estavam organizados em estágios diferentes em porções distintas, particularmente no inverno, assemelhando-se ao modelo de recrutamento de túbulos (HAMEL; HIMMELMAN; DUFRESNE, 1993; HAMEL; MERCIER, 1996; RAMOFAFIA *et al.*, 2000; RAMOFAFIA; BYRNE, 2001; RAMOFAFIA; BYRNE; BATTAGLENE, 2003). Consequentemente, não tem como definir um único estágio para o mesmo animal. O outro modelo conhecido é o de uniformidade no desenvolvimento, em que os túbulos apresentam o mesmo estágio reprodutivo em todo o comprimento, situação que não foi observada (SMILEY, 1988; MUTHIGA; KAWAKA, 2009; GHOBADYAN *et al.*, 2012).

6.4.2 Análise de cores e lipídeos das gônadas

A coloração dos túbulos diferenciou-se ao longo do ano e dependeu do estágio de maturidade. Bueno *et al.* (2015) identificou as cores amarelo-esbranquiçada em ambos os sexos para o estágio de crescimento; vermelho em fêmeas e creme em machos para o estágio maduro; translúcido para ambos os sexos no estágio esgotado. Leite-Castro *et al.* (2016) identificou em *H (H) grisea* do litoral do Ceará as cores: rosa escuro em fêmeas e creme em machos para o estágio maduro; castanho em ambos os sexos para o estágio pós-desova; transparente ou azulado em ambos os sexos para o estágio em crescimento inicial; rosa transparente em fêmeas e creme transparente em machos para o estágio de proliferação.

Neste trabalho as cores coincidem com as descrições de Bueno *et al.* (2015) e Leite-Castro *et al.* (2016) para *H (H) grisea*. No inverno, as fêmeas apresentaram a maior variabilidade de cores. Para o estágio de proliferação, as cores 5B 6/6, 7,5 RP 7/10 e N8 aparecem nas fêmeas e nos machos as cores N7, N8 e N9, assemelhando-se com as cores creme, rosa transparente, azulado, transparente ou translúcido. Nesse estágio, ainda, as gônadas apresentam menores quantidades de gametas e estão majoritariamente vazias, explicando as cores neutras (NAVARRO; GARCIA-SANZ; TUYA, 2012), explicando a diversidade de cores nas gônadas.

Com a produção e maturação dos gametas, a cor 5RP 7/8 apareceu nas gônadas das fêmeas e predominou a cor 10YR 8/6 nos machos, indicando o preenchimento dos túbulos por gametas (BUENO *et al.*, 2015; LEITE-CASTRO *et al.*, 2016; PEREIRA, 2017). Na maturação máxima e emissão do inverno, as fêmeas apresentaram alta variabilidade de cores (degradê em tons de rosa), mas também a

cor 10YR 8/6 (creme) exclusiva de machos. Isso poderia indicar alguma similaridade na composição bioquímica com os machos, porém estudos focados na identificação desses compostos são necessários para confirmação.

A cor é um aspecto usado como dimorfismo sexual, mas pode exibir grandes fragilidades. Outras holotúrias apresentam cores distintas ou semelhantes e possuem sexos e estágios diferentes, como *Holothuria arguinensis*, *Holothuria mammata*, *Stichopus herrmanni* e *Stichopus variegatus* (HAMEL; HIMMELMAN; DUFRESNE, 1993; MARQUET *et al.*, 2017; SETIAWATI *et al.*, 2021). Logo, o uso exclusivo das cores como parâmetro de sexagem ou identificação de estágio não pode ser considerado confiável, sendo de grande utilidade a análise microanatômica dos tecidos. A subjetividade da definição das cores torna os dados não comparáveis entre pesquisadores, sendo pertinente e indicado o uso de códigos padronizados.

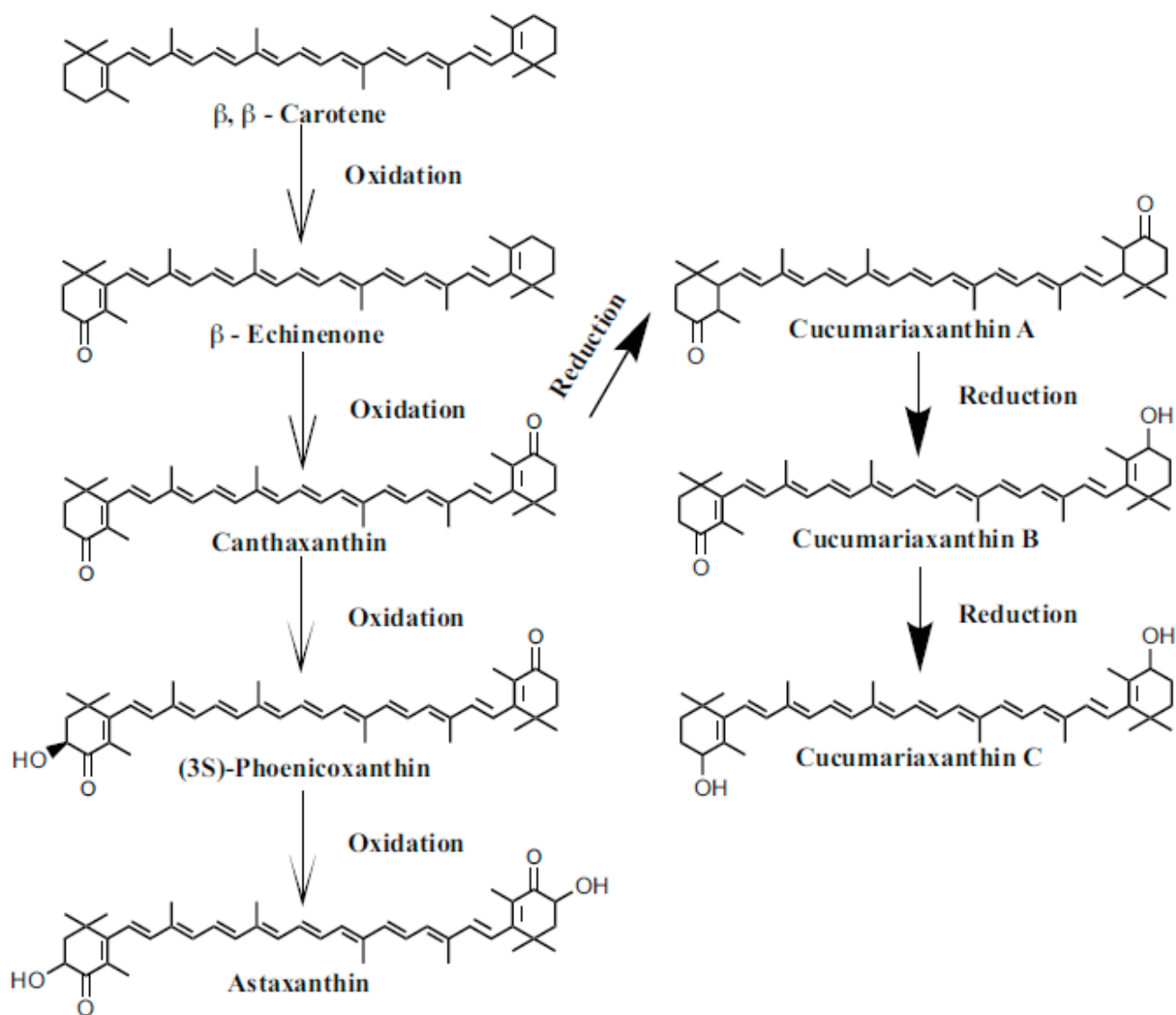
Os lipídeos presentes nas gônadas podem ser categorizados em duas classes, os de reserva energética, triacilglicerol (TAG) e éter diacilglicerol (DAGE), e os que fornecem a típica coloração, os carotenoides (PROWSE *et al.*, 2009). Assim, os maiores percentuais de lipídeos no período de maior desenvolvimento gonadal é resultante do acúmulo dos lipídeos energéticos, principalmente o DAGE que pode chegar a representar 55% dos lipídeos totais (ABUZAYTOUN *et al.*, 2022).

As cores nas gônadas são resultantes da incorporação de metabólitos produzidos por algas, protistas, bactérias e/ou fungos consumidos pelos pepinos-do-mar, sendo a principal classe molecular os carotenoides, que exibem cores amarela, laranja, vermelha, azul e roxa (ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2014; CHASANAH *et al.*, 2016; GALASSO; CORINALDESI; SANSONE, 2017; MAOKA, 2020). As cores são resultantes da série de duplas ligações conjugadas (C=C) dos carotenoides (HENDRY, 1996).

Comumente são encontrados no trato digestório os pigmentos clorofila *c*, fucoxantina (macroalga marrom) e neoxantina (macroalga verde) (DAVID *et al.*, 2020). Em *Apostichopus japonicus* ocorre produção endógena de Astacina (ZHAO; CHEN; YANG, 2015). Os compostos Astaxantina, β -equinenona, cantaxantina e cucumariaxantina foram identificados em gônadas de *Holothuria atra*, *Holothuria leucospilota*, *Stichopus japonicus*, *Holothuria moebi* e *Holothuria pervicax*, sendo os responsáveis pela gama de variação de cores (MATSUNO *et al.*, 1969; MATSUNO *et al.*, 1995; BANDARANAYAKE; ROCHER, 1999).

Esses carotenoides são derivados de reações de oxidação e/ou redução do β -caroteno (figura 22) e possuem atividade antioxidante, sendo um mecanismo de proteção aos gametas contra o efeito da foto-oxidação e das espécies reativas de oxigênio, além de modularem o sistema imunológico por meio da provitamina A (MATSUNO *et al.*, 1995; GALASSO; CORINALDESI; SANSONE, 2017).

Figura 22. Proposta de vias metabólicas de carotenoides em pepino-do-mar.



FONTE: Abuzaytoun (2017)

6.5 CARBOIDRATOS

Os valores observados em *H. (H) grisea* são similares aos encontrados em *Holothuria scabra*, *H. arenicola*, *H. leucospilota*, *H. nobilis*, *Actinopyga lecanora*, *Cucumaria frondosa* e *H. parva* que possuem até 3% (ZHONG; KHAN; SHAHIDI, 2007; SALARZADEH *et al.*, 2012; OEDJOE, 2017). Por outro lado, Bechtel *et al.* (2013) e Roggartz *et al.* (2017), relataram quantidades significativamente maiores, entre 15% e 40% em *Parastichopus californicus* e *Parastichopus regalis*, respectivamente. Enquanto Roggartz *et al.* (2015) relatam ausência de carboidratos em *H. arguinensis*. Essa situação pode ser resultado de erros metodológicos, já que os carboidratos, principalmente a glicose, são encontrados em todos os organismos e estão envolvidos em várias funções vitais (JØRGENSEN, 2009).

A composição de carboidratos na parede do corpo varia entre espécies, fatores ambientais (temperatura, nutrição, predação) e sexo. Dentre os carboidratos encontrados estão o glicosamianoglicano sulfato de condroitina, sulfato de fucana, glicanos neutros ligados a glicogênio, glicogênio, holoturinas ou saponinas, glicosídeos triterpenoides e outros (ZHENG, *et al.*, 2019; KANG; SEO; PARK, 2015; LI *et al.*, 2021). Portanto, os carboidratos desempenham funções estruturais, sinalizadoras e metabólicas, sendo essenciais para a dieta humana (RASYID *et al.*, 2020).

Neste estudo, a parede do corpo apresentou percentual 5 vezes maior de carboidratos no inverno. Por serem animais pecilotérmicos, as variações na temperatura afetam diretamente o estado fisiológico e as funções metabólicas (BINYON, 1972). Dong, Dong e Ji (2008) observaram que pequenas variações na temperatura da água (± 2 e 4 °C) alteravam significativamente a velocidade de reação das enzimas Hexoquinase e a Piruvato quinase. A maior atividade dessas enzimas indica que a via glicolítica está estimulada e há aumento na eficiência de captação dos carboidratos. Dong *et al.* (2011) verificou que acima de 26 °C o

metabolismo anaeróbico aumenta gradativamente para dar suporte energético devido ao estresse térmico.

Kühnhold *et al* (2019) perceberam que o aumento da temperatura em 6 °C estimulou a taxa de respiração na árvore respiratória, a atividade da cadeia transportadora de elétrons e, assim, o consumo imediato dos carboidratos. Gao e colaboradores (2009) notou que a enzima amilase do trato digestório de *Apostichopus japonicus*, responsável pela quebra de carboidratos, teve sua atividade significativamente reduzida em temperatura de 28 °C e os organismos ingeriram menos alimento. Na coleta do verão, a temperatura da água na Praia de Guaratuba foi de 29 °C. Baseando-se nos resultados anteriores, o aumento da temperatura tem grandes efeitos no metabolismo de carboidratos dos pepinos-do-mar, desde enzimas de degradação no trato digestório às enzimas do metabolismo intracelular de outros tecidos, nesse caso, a parede do corpo. Pode-se sugerir e explicar que as variações entre as estações inverno e verão sejam resultados desses fatores.

6.6 PROTEÍNAS SOLÚVEIS

A porcentagem de proteínas relatada na literatura para a parede do corpo varia de acordo com o método de extração e dosagem. Para *H (H) grisea* a quantidade média de proteína (14%) foi superior a algumas espécies, *Holothuria mammata* (7.88%), *Cucumaria frondosa* (8.34%), *H. polii* (8.66%) e *H. tubulosa* (8.82%) (ZHONG; KHAN; SHAHIDI, 2007). Wen, Hu e Fan (2010) analisaram oito espécies de holotúrias e relatam variação de 40.7% a 63.3%. Oedjoe (2017) observou uma variação de 31.11% a 44.07%. Chang-Lee, Price e Lampila (1989) relatam valores menores entre 2.5 a 13.8%.

Assim, os pepinos-do-mar possuem uma parcela considerável de proteínas na parede do corpo e embora alguns tenham baixo teor, elas são de qualidade elevada e constituídas de todos os aminoácidos essenciais para o metabolismo humano (ELVEVOLL *et al.*, 2022). Dentre os aminoácidos mais abundantes, destacam-se a glicina, ácido glutâmico e arginina, responsáveis pelo estímulo de anticorpos, por ser precursor da glutatona e ativação dos Linfócitos T, respectivamente (BORDBAR; ANWAR; SAARI, 2011).

A maioria dos trabalhos que quantificam proteínas totais em alimentos e na parede do corpo do pepino-do-mar, como os citados acima, utilizam o método

Kjeldahl por ser considerado o oficial pela AOAC International. Ele consiste em quantificar todos os compostos nitrogenados, proteicos e não proteicos, a partir de um fator de conversão N, que varia com a natureza da matéria prima. Em resumo, a amostra é digerida com ácido sulfúrico, neutralizada, destilada e titulada com padrão (EVERS; HUGHES, 2002; MOORE *et al.*, 2010; ZAGURI *et al.*, 2020). Apesar deste estudo não realizar uma comparação direta entre os métodos, o teor de proteínas encontrado pode ser considerado satisfatório, tendo em conta que não foram testados parâmetros de otimização de extração, como temperatura, tempo e concentração de sal.

O método empregado para extração neste trabalho utilizou um meio altamente alcalino, com cloreto de sódio e em temperatura moderada (MÆHRE *et al.*, 2018). Essa condição permite que além das proteínas solúveis em solução aquosa, também solubilize o colágeno que é insolúvel e representa a maior parte das proteínas da parede do corpo seguido pela miosina, actina, fibrilina, tensilina e proteases (HEY; STAINSBY, 1965; SAITO *et al.*, 2002; BORDBAR; ANWAR; SAARI, 2011; ZEUGOLIS *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2020). Mæhre *et al.* (2018) destacam que essa condição propiciou alta eficiência de extração em tecido animal. Kever (2012) também relata que extrações em tecido muscular com 3.5% de NaCl resulta em bom rendimento. Ainda assim, os resultados encontrados para *H (H) grisea* podem estar subestimados, já que as proteínas insolúveis por meio desse método não foram quantificadas.

Em relação aos dados entre as estações, foi observado um aumento no teor de proteínas no verão. Vergara e Rodríguez (2016) observaram o mesmo padrão em *Isostichopus* sp e esse fenômeno coincidia com o período reprodutivo, sugerindo que níveis ótimos de nutrientes convergem para esse momento. A *H (H) grisea* também se encontrava no período reprodutivo, reafirmando o padrão de investimento para a reprodução.

Outra resposta ao aumento da temperatura é a expressão de proteínas de choque térmico (Hsp 70, Hsp90a e Hsp90b) como mecanismo de defesa (JI; DONG; DONG, 2008; DONG *et al.* 2011; KÜHNHOLD *et al.*, 2019). Nesse contexto de estresse, essas proteínas previnem a agregação e solubilizam outras proteínas agregadas, promovem o redobramento de proteínas desnaturadas e auxiliam no processo de eliminação de proteínas aberrantes (ROSENZWEIG *et al.*, 2019). Esse evento é energeticamente custoso e mobiliza as vias de catabolismo para formação

de ATP para dar suporte a síntese, reparo e reposição das proteínas (SOMERO, 2002). Desse modo, corrobora-se a explicação da redução dos níveis de carboidratos e o aumento de proteínas no verão.

6.7 COMPOSIÇÃO E ÍNDICE DE QUALIDADE DE ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos mais abundantes nos diferentes tecidos de *H (H) grisea* no verão e inverno foram os C 16:0, C18:0, C 20:4, C 20:1, C 20:3 e C 20:4n-6. Os poliinsaturados equivalem entre 20-60% dos lipídeos totais presente nos equinodermos, sendo o mais frequente o ácido graxo C20:4n-6 (ZHUKOVA, 2022). Os representantes da classe Holothuroidea possuem um ácido graxo monoinsaturado (C23:1n-9) considerado um marcador quimiotaxonômico (ZHUKOVA, 2022) e em *H (H) grisea* foram identificados dois ácidos graxos C23:1, sendo que aparecem no cromatograma em 34.38 minutos e o outro em 34.51 minutos ($m/z = 366$), indicando ser o marcador.

Em relação a parede do corpo, houve maior conteúdo de saturados e monoinsaturados, resultado similar ao encontrado por Ahmed *et al.* (2022) para *Holothuria scabra*, *Holothuria nobilis* e *Pearsonothuria graeffei*. Esses resultados diferem do observado em *Holothuria tubulosa*, *Holothuria polii*, *Holothuria mammata* que predomina ácidos graxos poliinsaturados e *Holothuria fuscogilva*, *Holothuria fuscopunctata*, *Stichopus herrmanni* e *Actinopyga caerulea* que predomina ácidos graxos saturados (WEN; HU; FAN, 2010; AYDIN *et al.*, 2011). Diferenças inter- e intraespécies estão relacionadas a localidade, sexo, idade, estresse, temperatura da água e, principalmente, a disponibilidade de nutrientes. Neto *et al.* (2006) demonstraram que a composição lipídica de algumas holotúrias são fortemente influenciadas pelo tipo de nutriente e pela taxa de consumo.

O ácido graxo poliinsaturado em maior quantidade foi o 20:4n-6 (Ácido araquidônico, ARA), corroborando com o apresentado na literatura para os pepinos-do-mar (KASAI, 2003; WEN; HU; FAN, 2010; AYDIN *et al.*, 2011; BECHTEL *et al.*, 2013; HASEGAWA *et al.*, 2014; ARDIANSYAH *et al.*, 2022; ZHUKOVA, 2022). Esse ácido graxo é precursor de eicosanoides, que por sua vez, são moléculas moduladoras de resposta inflamatória. Por exemplo, o tromboxano A₂ é uma molécula derivada do ARA que tem ação na agregação plaquetária e efeito vasoconstritor (GIL, 2002). Além disso, os pepinos-do-mar ainda possuem os

polissacarídeos sulfato de condroitina e fucana sulfatada com efeito antitrombótico, que podem agir antagonicamente ao tromboxano, tendo potenciais aplicações terapêuticas e clínicas (CHEN *et al.*, 2012).

A biossíntese primária dos poliinsaturados em equinodermos é derivado da biota intestinal por meio, das bactérias *Vibrio* sp e *Shewanella* sp, microalgas fotossintéticas e protistas heterotróficos (MONROIG; TOCHER; NAVARRO, 2013). Em *Apostichopus japonicus*, foi identificado a presença de *Pseudomonas* sp como o 2º maior grupo de bactéria intestinal após *Vibrio* sp (GAO *et al.*, 2017). Esses organismos modificam os ácidos graxos saturado C18:0 e/ou C16:0 através de uma sequência de reações enzimáticas (dessaturase, elongase, isomerase e redutase), produzindo C18:2n-6, C18:3n-3, C20:3n-3 e C20:6n-3 (MONROIG; TOCHER; NAVARRO, 2013). Neste estudo foi observado proporções > 8% de C 16:0 e C 18:0 no trato digestório de *H (H) grisea* no verão e inverno e em ambos os sexos, confirmando que eles são substratos para o metabolismo da microbiota. As bactérias do trato digestório e do ambiente também são responsáveis pela síntese de ácidos graxos de cadeia ímpar, como C 15:0, C 17:0, C 19:0 e C 21:0 (PERRY *et al.*, 1979; DALSGAARD *et al.*, 2003). Assim, a microbiota desempenha grande papel na síntese e disponibilização dos ácidos graxos para os tecidos do corpo.

A composição de ácidos graxos da parede do corpo e das gônadas é determinada, portanto, pela microbiota intestinal e pela dieta. O aumento na ingestão de lipídeos em *Apostichopus japonicus* resultou em maiores índices de EPA e DHA (LIAO *et al.*, 2015). Hasegawa *et al.* (2014) observaram que diferentes dietas alterou a composição da parede do corpo de juvenis de *Apostichopus japonicus* quando comparado com o grupo controle e que os ácidos graxos coincidiam com a composição do alimento fornecido. No entanto, deve-se ter cuidado com a proposta de dieta em cultivo porque a microbiota desses invertebrados é mais fluida que a dos vertebrados terrestres e mais sensível ao tipo de nutriente (RINGØ *et al.*, 2016), o que pode causar alterações metabólicas significativas.

Os índices de IA, IT e h/H são parâmetros que permitem avaliar a qualidade nutricional e quão saudáveis são os alimentos, possibilitando ao consumidor escolher produtos mais benéficos para saúde (ATTIA *et al.*, 2017). Os índices IA e IT estão associados a formação trombos, ateroma e agregação plaquetária, portanto, valores menores indicam melhor qualidade nutricional e o inverso é desejável para o

h/H que está associado ao metabolismo de colesterol (RODRIGUES *et al.*, 2017; BIANCOLINO *et al.*, 2022).

Neste estudo os menores valores registrados no verão de IA e IT (machos) e os maiores valores de h/H (fêmeas), indicando que, do ponto vista nutricional, essa estação seria a melhor para consumi-los. Esses dados foram melhores que os observados para *Holothuria polii* (IA 0.61, IT 0.4, h/H 8.5) e *Holothuria tubulosa* (IA 1.38, IT 0.55) (ZMEMLIA *et al.*, 2020; BIANCOLINO *et al.*, 2022). Os trabalhos sobre composição de ácidos graxos não utilizam esses índices de qualidade para avaliação dos resultados, sendo essa uma dificuldade em comparar com outras espécies.

Em relação as gônadas, os machos apresentaram mais poliinsaturados em ambas as estações. O mesmo foi observado por David *et al.* (2023) para *Holothuria forskali*, sendo proposto que esses ácidos graxos têm maior significância metabólica nesse sexo. Zhang *et al.* (2023) observaram que no trato digestório de machos há maior expressão do gene que codifica a enzima ácido graxo sintase (FASN) e especulam que a variabilidade de poliinsaturados nas gônadas são resultados do metabolismo intestinal. Xu *et al.* (2016) verificaram a transferência de ácidos graxos entre tecidos e que as gônadas podem estocar poliinsaturados.

Gianasi *et al.* (2016) analisaram como dietas com diatomáceas e ovos de peixes influenciavam na biometria e reprodução de *Cucumaria frondosa*. Em resumo, os animais que foram tratados com ovos de peixes, ricos em lipídeos, responderam com o aumentos nos índices corpóreos (gônadas, trato digestório e árvore respiratória) e com maiores e distintos diâmetros de ovócitos. A proporção de poliinsaturados também aumentou. Eles demonstraram que as dietas afetaram diretamente a produção, qualidade e viabilidade dos gametas, sendo, portanto, uma condição essencial para o sucesso no cultivo e reprodução de holotúrias.

Portanto, compreender como e quais ácidos graxos são utilizados pelas gônadas direciona as estratégias de cultivo de holotúrias. A composição bioquímica da dieta deve conter os nutrientes essenciais tanto para o metabolismo energético quanto para o somático, circunstância que só é possível a partir do aprofundamento dos conhecimentos bioquímicos básicos de cada espécie e como as dietas e fatores ambientais influenciam na variação da composição.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *H (H) grisea* mostrou ter uma composição bioquímica a nível de carboidratos (2.5%), proteínas (14.8%), lipídeos (20%, parede do corpo; 26% trato digestório; 83% gônadas) e ácidos graxos satisfatória quando comparada a outras espécies. A composição bioquímica alterou-se a depender do sexo e da estação do ano para alguns tecidos, assim como o estágio reprodutivo. Em relação aos fatores abióticos, a temperatura e a matéria orgânica do sedimento afetaram a fisiologia e comportamento dos pepinos-do-mar, estabelecendo determinado grau de correlação entre as variáveis. Sugere-se que haja mais estudos com *H (H) grisea* para observar e conhecer melhor o efeito desses fatores, principalmente em relação ao sexo, já que o dimorfismo sexual é bem conhecido.

As medidas biométricas indicaram que a utilização dessa espécie diretamente do seu habitat não é ideal para seu uso no comércio, porque apresentam pouca biomassa quando comparada com os principais pepinos-do-mar. No entanto, experimentos com sua utilização em sistema de aquicultura podem resultar em melhores índices corpóreos, visto que o tipo de dieta afeta significativamente os parâmetros fisiológicos.

Os métodos de extração de carboidratos, lipídeos e proteínas foram considerados adequados para a proposta do trabalho. Em especial o utilizado para extração das proteínas da parede do corpo, sendo uma alternativa ao método padrão que é mais laborioso e que requer ajustes a depender do tipo de matéria prima. Ao que se refere a quantificação por espectrofotometria, o método de Bradford apesar de ser mais sensível a pequenas concentrações de proteínas, foi inadequado para o atual trabalho, pois foi afetado pela presença de sal. Inversamente, o método do Biureto foi o mais eficaz.

A composição de ácidos graxos da parede do corpo demonstrou que o verão seria a melhor época para consumo desses organismos. Apesar de não existir diferença significativa entre as médias de ácidos graxos, houve diferença na composição dos ácidos graxos que determinam os índices aterogênicos (IA), trombogênico (IT) e a razão hipocolesterolêmica/hipercolesterolêmica (h/H).

REFERÊNCIAS

- ABUZAYTOUN, Reem *et al.* Unusual Ether Lipids and Branched Chain Fatty Acids in Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*) Viscera and Their Seasonal Variation. **Marine drugs**. v. 20, nº 435, 2022.
- ABUZAYTOUN, Reem. Seasonal variation of lipid and carotenoid content of *Cucumaria frondosa* viscera oil and the development of methods for its quality control. Tese (Doutorado) - Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, 2017.
- AHMED, H. O. *et al.* Biochemical composition of some Echinodermata (Holothuroidea, Echinoidea) from the Red Sea, Egypt. **Brazilian Journal of Biology**. v. 82, 2022.
- ANDERSON, S. C; LOTZE, H. K; SHACKELL, N. L. Evaluating the knowledge base for expanding low trophic-level fisheries in Atlantic Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 2008.
- ANTUN, Alex Elias; BALDIN, Nelma. Pegada Ecológica: percepção de crianças em caminhadas na natureza. **Revista Paranaense de Desenvolvimento-RPD**, v. 34, n. 124, p. 245-265, 2013.
- APPLETON, Katherine M. *et al.* Sensory and physical characteristics of foods that impact food intake without affecting acceptability: Systematic review and meta-analyses. **Obesity reviews**, v. 22, n. 8, 2021.
- ARDIANSYAH, A. *et al.* Fatty acid from sea cucumber: Mini review. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2022.
- ATTIA, Youssef A. *et al.* Fatty acid and cholesterol profiles, hypocholesterolemic, atherogenic, and thrombogenic indices of broiler meat in the retail market. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, p. 1-11, 2017.
- AYDIN, Mehmet *et al.* Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. **International journal of food science & technology**, v. 46, n. 3, p. 500-508, 2011.
- AZAM, KHAIRUL; SINGH, JYANTI JYOTISHMA. Development of Value Added Products from Dried Sea Cucumber (*Holothuria scabra*). **Journal of Oceanography and Marine Research**. v. 1, n. 108, 2013.
- BANDARANAYAKE, W. M.; ROCHER, A. Des. Role of secondary metabolites and pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. **Marine Biology**, v. 133, p. 163-169, 1999.

BASTOS, Marcele Fontenelle. Efeitos do condroitim sulfato fucosilado na malária. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2011.

BECHTEL, Peter J. *et al.* Chemical composition of the giant red sea cucumber, *Parastichopus californicus*, commercially harvested in Alaska. **Food science & nutrition**, v. 1, n. 1, p. 63-73, 2013.

BENÍTEZ-VILLALOBOS, Francisco; AVILA-POVEDA, Omar Hernando; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, Itandehui Sarai. Reproductive biology of *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: holothuroidea) from Oaxaca, Mexico. **Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms**, v. 1, n. 1, p. 13-24, 2013.

BIANDOLINO, Francesca *et al.* Occurrence and patterns of nutritional traits and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sea cucumber (*Holothuria polii*) tissues: benefits and risk for human health. **Food Quality and Safety**, v. 6, 2022.

BINYON, John. **Physiology of echinoderms**. 1.ed.Canada: Editora Pergamon Press, 1972

BISHOP, Wendy Giamberardino. Projeto de intervenção de educação ambiental: conscientização para a preservação da restinga da orla de Guaratuba-PR. Relatório (Especialista em Educação Ambiental) Programa de Pós-graduação em Educação Ambiental com ênfase em Espaços Educadores Sustentáveis da Universidade Federal do Paraná, Matinhos, 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 910–917, 1959.

BOLAND, Mike *et al.* Muscle proteins. **Encyclopedia of food chemistry**, p. 164-179, 2018.

BORDBAR, Sara; ANWAR, Farooq; SAARI, Nazamid. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. **Marine drugs**, v. 9, n. 10, p. 1761-1805, 2011.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUENO, Maristela de Lima *et al.* Gametogenesis and weight change of body organs of the sea cucumber *H (H) grisea* (Aspidochirotida: Holothuriidae) in Southern Brazil. **Revista de Biología Tropical**. v. 63, 2015.

BYRNE, M. *et al.* Reproduction in the diadematoid sea urchin *Centrostephanus rodgersii* in contrasting habitats along the coast of New South Wales, Australia. **Marine Biology**, v. 132, n. 2, p. 305-318, 1998.

BYRNE, Maria; CERRA, Anna. Lipid dynamics in the embryos of *Patiriella* species (Asteroidea) with divergent modes of development. **Development Growth and Differentiation**, v. 42, n. 1, p. 79–86, 2000.

CHANG-LEE, Maria V.; PRICE, Robert J.; LAMPILA, Lucina E. Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus* spp.). **Journal of Food Science**, v. 54, n. 3, p. 567-568, 1989.

CHASANAHA, Ekowati *et al.* Fatty acid profile, carotenoid content, and in vitro anticancer Activity of Karimunjawa and Lampung sea cucumber. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 117-124, 2016.

CHEN, Shiguo *et al.* Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 7, p. 989-1000, 2012.

CHIU, Huai Hsuan; KUO, Ching Hua. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. **Journal of Food and Drug Analysis**. [S.l.]: Elsevier Taiwan LLC, 2020

CONAND, C. Commercial Sea cucumbers: a review for the Western Indian Ocean. **WIOMSA Book Series**. n.5, 2007.

CONAND, C. The fishery resources of Pacific Island countries. Part 2: Holothurians. **FAO Fisheries Technical Paper**. v. 2. n. 272. p. 143, 1989.

COSTA, Paulo Bernardes da. Sobrevivência, crescimento e capacidade de reciclagem de matéria orgânica do pepino-do-mar *H (H) grisea* Selenka, 1867 (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida). Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – Florianópolis, SC, 2010.

DALSGAARD, Johanne *et al.* Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. **Advances in marine biology**. v. 46, p.225-340, 2003.

DAR, Mahmoud A.; AHMAD, Hamdy O. The feeding selectivity and ecological role of shallow water holothurians in the Red Sea. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 24, p. 11-21, 2006.

DAS, Undurti N. Essential fatty acids-a review. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 467-482, 2006.

DAVID, Frank *et al.* Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids. *Aquaculture Nutrition*, v. 26, n. 5, p. 1568–1583, 1 out. 2020.

DAVID, Frank *et al.* Sex-specific seasonal variations in the fatty acid and carotenoid composition of sea cucumber gonads and implications for aquaculture. **Marine Biology**, v. 170, n. 4, p. 47, 2023.

DEAN, Walter E. Determination of carbonate and organic matter in Calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods. **Journal of Sedimentary Research**. v.44, n. 1, p. 242-248, 1974.

DELIMA, David John Eliezar; TRIO, Phoebe. Method validation for protein quantitation of fish muscle tissues from Lake Taal, Batangas. **KIMIKA**, v. 30, n. 2, p. 5-16, 2019.

DIAS, Ítala Farias. Distribuição Espaço-Temporal E Densidade Populacional De *H (H) grisea* (Holothuroidea: Aspidochirotida) Na Praia De Bitupitá, Ceará, Nordeste Do Brasil. 2012. 1–71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

DJAWDAN, Minou *et al.* Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster*. **Physiological Zoology**, v. 69, n. 5, p. 1176-1195, 1996.

DOMMES, Veronika; WIRTZ-PEITZ, Ferdinand; KUNAU, Wolf-H. Structure determination of polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry—a comparison of fragmentation patterns of various derivatives. **Journal of chromatographic science**, v. 14, n. 8, p. 360-366, 1976.

DONG, Yun-wei *et al.* Physiological responses in a variable environment: relationships between metabolism, hsp and thermotolerance in an intertidal-subtidal species. **PLoS One**, v. 6, n. 10, 2011.

DONG, Yunwei; DONG, Shuanglin; JI, Tingting. Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. **Aquaculture**, v. 275, n. 1-4, p. 329-334, 2008.

DREWNOWSKI, Adam. Sensory Properties of Fats and Fat Replacements. **Nutrition reviews**. v.50, n.4, 1992.

DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.

DWORJANYN, Symon A.; PIROZZI, Igor; LIU, Wenshan. The effect of the addition of algae feeding stimulants to artificial diets for the sea urchin *Tripneustes gratilla*. **Aquaculture**, v. 273, n. 4, p. 624-633, 2007.

EECKHAUT, Igor *et al.* In-vitro fertilisation: a simple, efficient method for obtaining sea cucumber larvae year round. *In: Asia–Pacific tropical sea cucumber aquaculture. Proceedings of an international symposium held in Noumea, New Caledonia.* ACIAR Proceedings. pp. 40-49, 2012.

ELVEVOLL, Edel Oddny *et al.* Food Safety Risks Posed by Heavy Metals and Persistent Organic Pollutants (POPs) related to Consumption of Sea Cucumbers. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 3992, 2022.

ERIKSSON, Hampus *et al.* Contagious exploitation of marine resources. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 13, n. 8, p. 435-440, 2015.

EVERS, J. M.; HUGHES, C. G. Analysis. **Chemical Analysis**. 2002.

FERGUSON, John Carruthers. Feeding, Digestion and Nutrition in Echinodermata. In: FLORKIN, MARCEL; SCHEER, BRADLEY T. (Org.). *Chemical Zoology*. London: Academic Press, p. 71-76, 1969.

FLOREN, Adonis S. *et al.* A review of factors influencing the seagrass-sea cucumber association in tropical seagrass meadows. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 696134, 2021.

FOGLIETTA, Luz M. *et al.* A maturity index for holothurians exhibiting asynchronous development of gonad tubules. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 303, n. 1, p. 19-30, 2004.

GALASSO, Christian; CORINALDESI, Cinzia; SANSONE, Clementina. Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 96, 2017.

GAO, Fei *et al.* Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 4, p. 714-722, 2009.

GAO, Fei; XU, Qiang; YANG, Hongsheng. Seasonal biochemical changes in composition of body wall tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, v. 29, n. 2, p. 252–260, 2011.

GAO, Fei; YANG, Hongsheng. Tissue Biochemistry. In: YANG, Hongsheng; HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie (Ed.). **The sea cucumber *Apostichopus japonicus*: history, biology and aquaculture**. Academic Press, 2015.

GAO, M. L. *et al.* Bacterial diversity in the intestine of sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 17, n. 1, p. 318-325, 2017.

GEE, Clifford T. *et al.* Quantifying protein concentrations using smartphone colorimetry: a new method for an established test. **Journal of chemical education**, v. 94, n. 7, p. 941-945, 2017.

GENG, Chenfan *et al.* Effect of acute salinity stress on ion homeostasis, Na⁺/K⁺-ATPase and histological structure in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **SpringerPlus**, v. 5, p. 1-17, 2016.

GHOBADYAN, Fatemah *et al.* An investigation of the macroscopic and microscopic characteristics of gonadal tubules in the sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Persian Gulf, Iran). **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 32, p. 6-14, 2012.

GIANASI, Bruno L. *et al.* Influence of diet on growth, reproduction and lipid and fatty acid composition in the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *Aquaculture Research*, v. 48, n. 7, p. 3413–3432, 1 jul. 2016.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 388-396, 2002.

GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, Mercedes *et al.* A new insight into the influence of habitat on the biochemical properties of three commercial sea cucumber species. *International Aquatic Research*, v. 10, n. 4, p. 361–373, 1 dez. 2018.

GORNALL, Allan G; BARDAWILL, Charles J.; DAVID, Maxima M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. biol. Chem**, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

GRAHAM, Erin R.; THOMPSON, Joseph T. Deposit-and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 368, n. 1, p. 22-29, 2009.

GUIMARÃES, TLB. Determinação da cor do solo pela carta de munsell e por colorimetria. 2016. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia)-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília**, 2016.

GURR, Michael I. *et al.* **Lipids: biochemistry, biotechnology and health**. John Wiley & Sons, 2016.

HAMEL, Jean-François; HIMMELMAN, John H.; DUFRESNE, Louise. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). **The Biological Bulletin**, v. 184, n. 2, p. 125-143, 1993.

HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in temperate areas of the Northern Hemisphere. In V. Toral-Granda, A. Lovatelli and M. Vasconcellos (eds). Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. n. 516, 2008.

HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie. Studies on the reproductive biology of the Atlantic sea cucumber *Cucumaria frondosa*. **SPC bêche-de-mer Information Bulletin**, v. 8, p. 22-33, 1996.

HANSEN, Malene; FLATT, Thomas; AGUILANIU, Hugo. Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection?. **Cell metabolism**, v. 17, n. 1, p. 10-19, 2013.

HASEGAWA, Natsuki *et al.* Fatty acid composition in sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed with microbially degraded dietary sources. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 12, p. 2021-2031, 2014.

HEIRI, Oliver; LOTTER, André F; LEMCKE, Gerry. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. **Journal of paleolimnology**. v. 25, n. 1, p. 101-110, 2001.

HENDRY, G. A. F. Natural pigments in biology. In: **Natural food colorants**. Boston, MA: Springer US, p. 1-39, 1996.

HEY, C. D.; STAINSBY, G. The enhanced solubility of collagen following alkaline treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 97, n. 2, p. 364-366, 1965.

HO, Chuan-Kai; PENNING, Steven C. Consequences of omnivory for trophic interactions on a salt marsh shrub. **Ecology**, v. 89, n. 6, p. 1714-1722, 2008.

HOEGH-GULDBERG, O.; EMLET, R. B. Energy use during the development of a lecithotrophic and a planktotrophic echinoid. **The Biological Bulletin**, v. 192, n. 1, p. 27-40, 1997.

HUANG, Ning *et al.* The depolymerized fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber potentially inhibits HIV replication via interfering with virus entry. **Carbohydrate Research**. 2013.

HUDSON, Ian R. *et al.* Seasonality and selectivity in the feeding ecology and reproductive biology of deep-sea bathyal holothurians. **Progress in Oceanography**. v. 59, 2003.

HUDSON, Ian R. *et al.* Temporal variations in fatty acid composition of deep-sea holothurians: evidence of benthic-pelagic coupling. **Marine Ecology Progress Series**, v. 281, p. 109-120, 2004.

IBRAHIM, Mona Y. *et al.* The Proximate Composition and the Nutritional Value of Some Sea Cucumber Species Inhabiting the Sudanese Red Sea. **Food Science and Quality Management**. v.41, 2015.

ICHIHARA, Ken'ichi; FUKUBAYASHI, Yumeto. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, v. 51, n. 3, p. 635-640, 1 mar. 2010.

Ji, Tingting; DONG, Yunwei; DONG, Shuanglin. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature. **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 180-187, 2008.

JIANG, Hui *et al.* Chasing relationships between nutrition and reproduction: A comparative transcriptome analysis of hepatopancreas and testis from *Eriocheir sinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 227-234, 2009.

JÖNSSON, K. Ingemar. Capital and income breeding as alternative tactics of resource use in reproduction. **Oikos**, p. 57-66, 1997.

JØRGENSEN, N.O.G. Carbohydrates. *In: Encyclopedia of inland waters*. Thomas Mehner (Ed.). Academic Press, 2009.

KANG, Hee-Kyoung; SEO, Chang Ho; PARK, Yoonkyung. The Effects of Marine Carbohydrates and Glycosylated Compounds on Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**. v.16, n. 3, p. 6018-6056, 2015.

KASAI, Takamasa. Lipid contents and fatty acid composition of total lipid of sea cucumber *Stichopus japonicus* and Konowata (salted sea cucumber entrails). **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2003.

KAUTSARI, N. *et al.* Effect of temperature increase on gametes release of *Holothuria scabra*. **AACL Bioflux**, v. 13, n. 4, p. 2375-2387, 2020.

KEEVER, Brianna. **Salt concentration and species affects protein extractability and processed meat characteristics..** Tese de Doutorado. University of Illinois at Urbana-Champaign. 2012.

KERSTEN, Sander. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO reports**, v. 2, n. 4, p. 282-286, 2001.

KHOTIMCHENKO, Yu S. The Nutritional Value of Holothurians. **Russian Journal of Marine Biology**. v. 41, n. 6, 2015.

KHOTIMCHENKO, Yuri. Pharmacological potential of sea cucumbers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1342, 2018.

KINCH, J *et al.* Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in the Western Central Pacific. In: TORAL-GRANDA, V.; LOVATELLI, A.; VASCONCELLOS, M. (Org.). Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture, v. 5, p. 7–55, 2008.

KRISHNAN, S. Histochemical studies on reproductive and nutritional cycles of the holothurian, *Holothuria scabra*. **Marine Biology**, v. 2, n. 1, p. 54-65, 1968.

KÜHNHOLD, Holger *et al.* Temperature-induced aerobic scope and Hsp70 expression in the sea cucumber *Holothuria scabra*. **Plos one**, v. 14, n. 3, 2019.

KÜHNHOLD, Holger *et al.* Thermal stress effects on energy resource allocation and oxygen consumption rate in the juvenile sea cucumber, *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). **Aquaculture**, v. 467, p. 109-117, 2017.

KÜNİLİ, Ibrahim Ender; ÇOLAKOĞLU, Fatma Arik. Chemical and Nutritional Characteristics of *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788); A Seasonally Comparative Study. **Journal of aquatic food product technology**. 2019.

LEITE-CASTRO, Liliane Veras *et al.* Reproductive biology of the sea cucumber *H. (H) grisea* in Brazil: importance of social and environmental factors in breeding coordination. **Marine Biology**, v. 163, n. 3, 1 mar. 2016.

LEVITAN, Don R. Optimal egg size in marine invertebrates: theory and phylogenetic analysis of the critical relationship between egg size and development time in echinoids. **The American Naturalist**, v. 156, n. 2, p. 175-192, 2000.

LI, Shanni *et al.* Structural characterization and anticoagulant analysis of the novel branched fucosylated glycosaminoglycan from sea cucumber *Holothuria nobilis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 269, 2021.

LIAO, Ming-Ling *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance, body composition and digestive enzymes activity of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 1, p. 92-101, 2017.

LIU, Feng *et al.* Biochemical composition of the Australasian sea cucumber, *Australostichopus mollis*, from a nutritional point of view. **Nutrire**. v.42, n.12, 2017.

LOWE, Edgar F.; LAWRENCE, John M. Absorption efficiencies of *Lytechinus variegatus* (Lamarck)(Echinodermata: Echinoidea) for selected marine plants. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 21, n. 3, p. 223-234, 1976.

MÆHRE, Hanne K. *et al.* Protein determination—method matters. **Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2018.

MAKOVICKÝ, P.; JÍLEK, F. Short review of some properties of muscular proteins. **Ceskoslovenska Fysiologie**, v. 57, n. 1, p. 10-14, 2008.

MAOKA, Takashi. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of natural medicines**, v. 74, n. 1, p. 1-16, 2020.

MARQUET, Nathalie *et al.* Sea cucumbers, *Holothuria arguinensis* and *H. mammata*, from the southern Iberian Peninsula: variation in reproductive activity between populations from different habitats. **Fisheries Research**, v. 191, p. 120-130, 2017.

MARTIN, Joan Stadler. Studies on assimilation, mobilization, and transport of lipids by the fat body and haemolymph of *Pyrrhocoris apterus*. **J. Insect Physiol.**, v. 15, p.2319-2344, 1969

MATSUNO, T. *et al.* Gonadal pigment of sea-cucumber (*Holothuria leucospilota* Brandt). **Experientia**, v. 25, n. 12, p. 1253-1253, 1969.

MATSUNO, Takao; TSUSHIMA, Miyuki. Comparative biochemical studies of carotenoids in sea cucumbers. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 111, n. 4, p. 597-605, 1995.

MAYER, Lawrence M. The nature and determination of non-living sedimentary organic matter as a food source for deposit feeders. In: **Ecology of marine deposit feeders**. Springer New York, p. 98-113, 1989.

MCCURRY, J. D. GC analysis of total fatty acid methyl esters (FAME) and methyl linolenate in biodiesel using the revised EN14103: 2011 method. **Agilent Technologies Inc., USA**, 2012.

MENG, Xian-liang *et al.* Mortality of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, exposed to acute salinity decrease and related physiological responses: osmoregulation and heat shock protein expression. **Aquaculture**, v. 316, n. 1-4, p. 88-92, 2011.

MIOT, Hélio Amante. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal vascular brasileiro**, v. 16, p. 88-91, 2017.

MJØS, Svein A. The prediction of fatty acid structure from selected ions in electron impact mass spectra of fatty acid methyl esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 8, p. 550-560, 2004.

MONDOL, Muhammad Abdul Mojid *et al.* Sea Cucumber Glycosides: Chemical Structures, Producing Species and Important Biological Properties. **Marine drugs**. v. 15, n. 317, 2017.

MONROIG, Óscar; TOCHER, Douglas R.; NAVARRO, Juan C. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. **Marine drugs**, v. 11, n. 10, p. 3998-4018, 2013.

MOORE, Jeffrey C. *et al.* Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 4, p. 330-357, 2010.

MUTHIGA, N. A.; KAWAKA, J. A. The breeding pattern and variations in timing and reproductive output of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in Kenya. **Western Indian Ocean Journal of Marine Science**, v. 8, n. 2, 2009.

NAVARRO, Pablo G.; GARCIA-SANZ, Sara; TUYA, Fernando. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). **Scientia Marina**, v. 76, n. 4, p. 741-752, 2012.

NETO, Renato R. *et al.* The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 53, n. 3, p. 516-527, 2006.

OCHIEWO, Jacob *et al.* Socio-economic features of sea cucumber fisheries in southern coast of Kenya. **Ocean & Coastal Management**, v. 53, n. 4, p. 192-202, 2010.

OEDJOE, Marcelien Dj Ratoe. Composition of Nutritional Content of Sea Cucumbers (Holothuroidea) in Mania Waters, Sabu Raijua Regency, East Nusa Tenggara. **Journal of Aquaculture Research & Development**. v. 08, n. 07, 2017.

OMAR, H. A. *et al.* Reproductive periodicity of sea cucumber *Bohadschia vitiensis* (Echinodermata: Holothuroidea) in Hurghada area, Red Sea, Egypt. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 2, p. 115-123, 2013.

PANGESTUTI, Ratih; ARIFIN, Zainal. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. 2017.

PARANÁ. Prefeitura de Guaratuba. *Análise Temática Integrada – PARTE 1. Revisão do Plano Diretor de Guaratuba – PR*. Paraná: Prefeitura de Guaratuba, 2011. Acesso em: 05 de dezembro de 2022. Disponível em: http://portal.guaratuba.pr.gov.br/planodiretor/P2-AnaliseTematicaIntegrada-Parte1_vfinal5.pdf

PAWSON, David L. *et al.* Echinodermata of the Gulf of Mexico. **Gulf of Mexico: origin, waters, and biota**, v. 1, p. 1177-1204, 2009.

PAWSON, David L.; PAWSON, Doris J.; KING, Rachael A. A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). **Zootaxa**, v. 2449, n. 1, p. 1–48-1–48, 2010.

PEREIRA, Vanessa Alves. CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, MORFOLÓGICA E GENÉTICA DO SEXO EM PEPINO-DO-MAR *H (H) grisea*

(Selenka, 1987) NO NORDESTE DO BRASIL. 2017. 1–79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017.

PERRY, G. J. *et al.* Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. **Geochimica et cosmochimica acta**, v. 43, n. 11, p. 1715-1725, 1979.

PETERS-DIDIER, Josefina *et al.* Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida) in southern Chile. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 98, n. 2, p. 311-323, 2018.

PHAN, V. N. *et al.* Estudo bioenergetico de animais marinhos costeiros. 1. *Paralonchurus brasiliensis* (perciformes, sciaenidae). **Programa e Resumos**. n.10, 199-213, 1993.

POMIN, Vitor H. Holothurian Fucosylated Chondroitin Sulfate. **Marine drugs**. v. 12, 2014.

PONTE, Isabela de Abreu Rodrigues. A pesca, processamento artesanal e qualidade microbiológica do produto final do pepino-do-mar *H (H) grisea* selenka, 1867 (echinodermata: holothuroidea) no extremo litoral oeste do ceará. 2017. 1–72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PROWSE, T. A. A.; SEWELL, M. A.; BYRNE, M. Fuels for development: evolution of maternal provisioning in asterinid sea stars. **Marine Biology**, v. 153, p. 337-349, 2008.

PROWSE, Thomas AA *et al.* Long-term storage lipids and developmental evolution in echinoderms. **Evolutionary Ecology Research**, v. 11, n. 7, p. 1069-1083, 2009.

PURCELL, Steven W. *et al.* Ecological roles of exploited sea cucumbers. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**. v. 54, 2016.

PURCELL, Steven W. Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. Rome: FAO, 2010.

PURCELL, Steven W. **Processing sea cucumbers into beche-de-mer: A manual for Pacific Island fishers**. 2014.

PURCELL, Steven W.; WILLIAMSON, David H.; NGALUAFFE, Poasi. Chinese market prices of beche-de-mer: Implications for fisheries and aquaculture. **Marine Policy**, v. 91, p. 58-65, 2018.

RAHANTOKNAM, Santi Penina Tua. Maturity gonad sea cucumber *Holothuria scabra* under the month cycle. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2017.

RAMOFAFIA, C.; BYRNE, M.; BATTAGLENE, C. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. **Marine Biology**, v. 142, p. 281-288, 2003.

RAMOFAFIA, Christain; BYRNE, Maria. Assessment of the 'tubule recruitment model' in three tropical Aspidochirote holothurians. **SPC Beche-de-Mer Information Bulletin**, v. 15, p. 13-16, 2001.

RASOLOFONIRINA, Richard *et al.* Reproductive Cycle of Edible Echinoderms from the Southwestern Indian Ocean II. The Ssandfish *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). **Western Indian Ocean Journal of Marine Science**, v. 4, n. 1, p. 61-76, 2005.

RASYID, Abdullah *et al.* Evaluation of nutritional value of sea cucumber *Holothuria scabra* cultured in Bali, Indonesia. **AACL Bioflux**, v. 13, n. 4, 2020.

RINGØ, E. Z. Z. V. *et al.* Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?. **Aquaculture nutrition**, v. 22, n. 2, p. 219-282, 2016.

ROBERTS, David. Deposit-feeding mechanisms and resource partitioning in tropical holothurians. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 37, n. 1, p. 43-56, 1979.

ROCHA-SANTOS, Teresa; DUARTE, Armando C. Introduction to the analysis of bioactive compounds in marine samples. In: **Comprehensive Analytical Chemistry**. Elsevier, p. 1-13, 2014..

RODRIGUES, Bruna Leal *et al.* Fatty acid profiles of five farmed Brazilian freshwater fish species from different families. **PLoS One**, v. 12, n. 6, 2017.

ROGGATZ, Christina C. *et al.* A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). **Natural product research**, v. 32, n. 1, p. 116-120, 2017.

ROGGATZ, Christina C. *et al.* First report of the nutritional profile and antioxidant potential of *Holothuria arguinensis*, a new resource for aquaculture in Europe. **Natural product research**, v. 30, n. 18, p. 2034-2040, 2015.

ROSENZWEIG, Rina *et al.* The Hsp70 chaperone network. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 20, n. 11, p. 665-680, 2019.

SAITO, M. *et al.* Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). **Journal of food science**, v. 67, n. 4, p. 1319-1322, 2002.

SALARZADEH, Ali Reza *et al.* Proximate composition of two sea cucumber species *Holothuria pavra* and *Holothuria arenicola* in Persian Gulf. **Annals of Biological Research**, v. 3, n. 3, p. 1305-1311, 2012.

SANTANA FILHO, Arquimedes Paixão de. Análise metabolômica de linhagens de melanócitos e melanomas de origem humana e murina. Tese (Doutorado em Ciências – Bioqímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2013.

SANTOS, Katharine Raquel Pereira dos *et al.* Manual de técnica histológica de rotina e de colorações. Universidade Federal de Pernambuco. 32 p., 2021.

SANTOS, Rita *et al.* Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. **Aquaculture research**, v. 47, n. 7, p. 2307-2323, 2016.

SCREMIN, Renata; FURQUIM, Suelen; DUBIASKI-SILVA, Janete. Fatores determinantes na distribuição de *Bunodosoma caissarum* Corrêa in Belém, 1987 (Cnidaria, Actiniaria) em um costão rochoso na costa sudeste do Brasil. **Estudos de Biologia**, v. 35, n. 85, 2013.

SETIAWATI, Ketut Maha *et al.* Growth and reproduction performance of sea cucumber (*Stichopus* sp.) fed with different feed regime. In: **E3S Web of Conferences**. EDP Sciences, 2021.

SLATER, Matthew; CHEN, Jiaxin. Sea cucumber biology and ecology In: **Echinoderm Aquaculture**. New Jersey: Wiley-Blackwell, p. 47-56, 2015.

SMILEY, Scott. The dynamics of oogenesis and the annual ovarian cycle of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea). **The Biological Bulletin**, v. 175, n. 1, p. 79-93, 1988.

SOIL SURVEY DIVISION STAFF. Soil Conservation Service. U. S. Department of Agriculture Handbook 18. **Soil survey manual**. 2017.

SOMERO, George N. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 4, p. 780-789, 2002.

SROYRAYA, Morakot *et al.* Nutritional components of the sea cucumber *Holothuria scabra*. **Functional Foods in Health and Disease**. v.7, n.3, 2017.

STICKLE, William B.; AHOKAS, Robert. The effects of tidal fluctuation of salinity on the perivisceral fluid composition of several echinoderms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 47, n. 2, p. 469-476, 1973.

SUN, Guo-Quan *et al.* Two new cytotoxic nonsulfated pentasaccharide holostane (= 20-hydroxylanostan-18-oic acid γ -lactone) glycosides from the sea cucumber *H (H) grisea*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 8, p. 1453-1460, 2008.

SUN, Jiamin *et al.* Effect of water temperature on diel feeding, locomotion behaviour and digestive physiology in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 9, p. jeb177451, 2018.

SUN, Jiamin *et al.* Growth, health and biochemical composition of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* after multi-year holding in effluent Waters of land-based salmon culture. **Aquaculture environment interactions**. v.12, 2020.

SUSETYA, I. E. *et al.* Characteristics of environment and habitat of sea cucumbers in Pane Island, Tapanuli Tengah Regency. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**. v. 454, 2020.

SVETASHEV, V. I. *et al.* Lipid and fatty acid composition of holothurians from tropical and temperate waters. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 98, n. 4, p. 489-494, 1991.

SWANSON, Danielle; BLOCK, Robert; MOUSA, Shaker A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. **Advances in nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2012.

TAGHON, Gary L. Modeling deposit feeding. In: **Ecology of marine deposit feeders**. Springer New York, p. 223-246, 1989.

TAKEMAE, Nobuhiro; NAKAYA, Fumio; MOTOKAWA, Tatsuo. Low oxygen consumption and high body content of catch connective tissue contribute to low metabolic rate of sea cucumbers. **The Biological Bulletin**, v. 216, n. 1, p. 45-54, 2009.

TAMORI, Masaki; TAKEMAE, Chigusa; MOTOKAWA, Tatsuo. Evidence that water exudes when holothurian connective tissue stiffens. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 11, p. 1960-1966, 2010.

TANIKAWA, Eiichi; AKIBA, Minoru; YOSHITANI, Setsuko. Studies on the nutritive value of the meat of sea cucumber (*stichopus japonicus* selenka). **Bulletin of the faculty of fisheries hokkaido university**. v.5, n.4, 1955.

TAVARES, Y. A. G.; BORZONE, C. A. Reproductive cycle of *Mellita quinquiesperforata* (Leske) (Echinodermata, Echinoidea) in two contrasting beach environments. **Rev. Bras. Zool.**, v. 23, p: 573-580, 2006.

TAVARES, Yara A. G. *et al.* Citometría y los eventos de la oogénesis de *H (H) grisea* Selenka, 1867 en el sur de Brasil: subsidios para el cultivo. **Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Equinodermos**. 2022

TEHRANIFARD, Akram *et al.* Reproductive cycle of *Stichopus herrmanni* from Kish Island, Iran. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 24, p. 22-27, 2006.

THOMPSON, R. J. The relationship between food ration and reproductive effort in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Oecologia**, v. 56, n. 1, p. 50-57, 1982.

TOLON, Mustafa Tolga; ENGIN, Serhat. Gonadal development of the holothurian *Holothuria polii* (Delle Chiaje, 1823) in spawning period at the Aegean Sea (Mediterranean Sea). **Ege Journal of Fisheries & Aquatic Sciences (EgeJFAS)/Su Ürünleri Dergisi**, v. 36, n. 4, 2019.

USTYUZHANINA, Nadezhda E. *et al.* Fucosylated Chondroitin Sulfates from the Sea Cucumbers *Paracaudina chilensis* and *Holothuria hilla*: Structures and Anticoagulant Activity. **Marine drugs**. v. 18, n. 540, 2020.

UTHICKE, Sven; KAREZ, Rolf. Sediment patch selectivity in tropical sea cucumbers (Holothurioidea: Aspidochirotida) analysed with multiple choice experiments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 236, n. 1, p. 69-87, 1999.

VENÂNCIO, Eliana *et al.* Reproductive biology of the Sea cucumber *Holothuria mammata* (Echinodermata: Holothuroidea). **Biology**, v. 11, n. 5, p. 622, 2022.

VERGARA, Wensy; RODRÍGUEZ, Adriana. Nutritional Composition of Sea Cucumber *Isostichopus sp.* **Natural Resources**, v. 7, n. 03, p. 130, 2016.

VIDOLIN, Denilton; SANTOS-GOUVEA, Ivonete A.; FREIRE, Carolina A. Osmotic stability of the coelomic fluids of a sea-cucumber (*H. (H) grisea*) and a starfish (*Asterina stellifera*)(Echinodermata) exposed to the air during low tide: a field study. **Acta Biológica Paranaense**, v. 31, n. 1, p. 2, 2002.

VILLINSKI, Jeffrey T. *et al.* Convergent maternal provisioning and life-history evolution in echinoderms. **Evolution**, v. 56, n. 9, p. 1764-1775, 2002.

WANG, Yanchao *et al.* Investigation of structural proteins in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) body wall. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18744, 2020.

WEN, Jing; HU, Chaoqun; FAN, Sigang. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 14, p. 2469-2474, 2010.

WIEDEMEYER, Winfried L. Feeding behaviour of two tropical holothurians, *Holothuria scabra* and *H. atra* from Okinawa, Japan. **Proceedings of the Seventh International Coral Reef Symposium**. Guam, v. 2, 1992.

WULANDARI, Diah Anggraini; SYAHPUTRA, Gita; PUTRA, Masteria Yunovilsa. The Bioactive Compound and Mechanism of Action of Sea Cucumber (Holothuridae) As Anticancer: A Review. **J. Pure App. Chem. Res.** v.9, n. 3, 2020.

XIA, Sudong *et al.* Feeding preferences of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) on various seaweed diets. **Aquaculture**, v. 344, p. 205-209, 2012.

XU, Qinzeng *et al.* Fatty acid component in sea cucumber *Apostichopus japonicus* from different tissues and habitats. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 96, n. 1, p. 197-204, 2016.

YAHYAVI, Maziar *et al.* Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilata* from Qeshm Island (Persian Gulf). **African Journal of Biotechnology**. v. 11, n.12, 2012.

YANG, Hongsheng *et al.* Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1085-1092, 2005.

ZAGURI, Moshe *et al.* Protein quantification in ecological studies: a literature review and empirical comparisons of standard methodologies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1240-1251, 2020.

ZEUGOLIS, D. I. *et al.* Collagen solubility testing, a quality assurance step for reproducible electro-spun nano-fibre fabrication. A technical note. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 19, n. 10, p. 1307-1317, 2008.

ZHANG, Kai *et al.* Effects of heat treatment on the gel properties of the body wall of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). **Journal of food science and technology**, v. 54, p. 707-717, 2017.

ZHANG, M. *et al.* The new drying technology of sea cucumber. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2021.

ZHANG, Shuangyan *et al.* Examination of sex-related differences in intestinal and gonadal lipid metabolism in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Aquaculture**, v. 562, p. 738787, 2023.

ZHAO, Heling; CHEN, Muyan; YANG, Hongsheng. Albinism. In: YANG, Hongsheng; HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie (Ed.). **The sea cucumber *Apostichopus japonicus*: history, biology and aquaculture**. Academic Press, 2015.

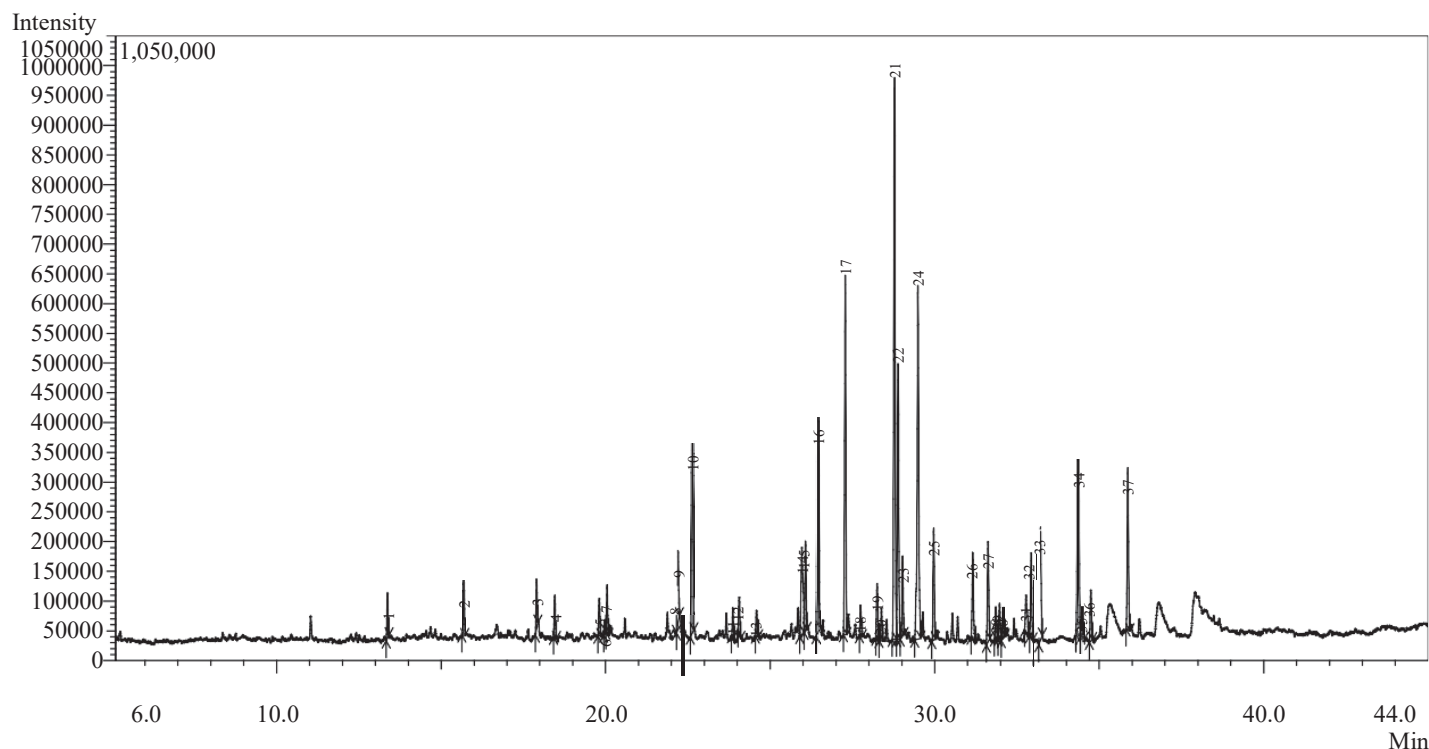
ZHENG, Wenqi *et al.* Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of the polysaccharides from sea cucumber *Pattalus mollis*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, p. 198, 2019.

ZHONG, Ying; KHAN, Muhammad Ahmad; SHAHIDI, Fereidoon. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1188-1192, 2007.

ZHUKOVA, Natalia V. Fatty Acids of Echinoderms: Diversity, Current Applications and Future Opportunities. **Marine Drugs**, v. 21, n. 1, p. 21, 2022.

ZMEMLIA, N. *et al.* Biochemical composition and antioxidant potential of the edible Mediterranean sea cucumber *Holothuria tubulosa*. **Grasas y aceites**. v. 71, n.3, 2020.

ANEXO 1 – CROMATOGRAMA DE LIPÍDEOS PRESENTES EM *H (H) GRISEA*



Peak#	R.Time	Area Name
1	13.370	173808 Hexadecane
2	15.670	216387 Tetradecane
3	17.901	195493 Heptadecane
4	18.454	177790 Methyl tetradecanoate
5	19.807	154507 Pentadecanoic acid, methyl ester
6	19.973	45852 Tridecanoic acid, 12-methyl-, methyl ester
7	20.045	179996 Heptadecane
8	22.099	177774 Heptadecane
9	22.201	263333 9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
10	22.630	793406 Hexadecanoic acid, methyl ester
11	23.864	116184 Hexadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester
12	24.059	164313 Heptadecane
13	24.584	113639 Methyl stearate
14	25.963	611669 6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
15	26.075	383781 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester
16	26.457	916627 Methyl stearate
17	27.281	1613306 Dodecane, 1,1-dimethoxy-
18	27.746	132225 2-Methylhexacosane
19	28.248	243585 Nonadecanoic acid, methyl ester
20	28.380	144381 Dodecane, 1,1-dimethoxy-
21	28.780	2841466 5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid, methyl ester,
22	28.887	1318267 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid, methyl es
23	29.023	344982 Dodecane, 1,1-dimethoxy-
24	29.489	2064589 6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
25	29.969	479898 Methyl 18-methylnonadecanoate
26	31.157	415101 6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
27	31.623	470570 Heneicosanoic acid, methyl ester
28	31.857	142036 Methyl 4,7,10,13,16-docosapentaenoate
29	31.971	162661 Methyl 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoate
30	32.093	141267 Methyl 8,11,14,17-eicosatetraenoate
31	32.774	233524 6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
32	32.932	360444 cis-10-Nonadecenoic acid, methyl ester
33	33.214	502895 Docosanoic acid, methyl ester
34	34.372	811894 cis-10-Nonadecenoic acid, methyl ester
35	34.482	162763 Cyclopropaneoctanoic acid, 2-octyl-, methyl e
36	34.744	227819 Tricosanoic acid, methyl ester
37	35.870	726574 cis-10-Nonadecenoic acid, methyl ester
		18224806

CAPÍTULO 2 - COMPARAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS ENTRE OS MÉTODOS DE BRADFORD E BIURETO

1 INTRODUÇÃO

Os métodos Bradford e Biureto são amplamente utilizados na dosagem de proteínas solúveis em amostras de diferentes matrizes, como leite, plasma, lágrimas, tecido de plantas e animais, produtos alimentícios, urina e outras (SAVORY; PU; SUNDERMAN, 1968; MATTOO; ISHAQ; SALEEMUDDIN, 1987; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998; FARIAS *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2014). Contudo, essas amostras podem possuir componentes que interferem nas reações químicas, por exemplo, detergentes, glicerol, 2-mercaptoetanol, carboidratos, amônio, flavonoides, hemoglobina e sais resultando em dados super ou subestimados (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949; BRADFORD, 1976; COMPTON; JONES, 1985; BANIK *et al.*, 2009). Por isso, a escolha ou a adaptação do método é crucial para reduzir os efeitos dos interferentes e obter resultados confiáveis.

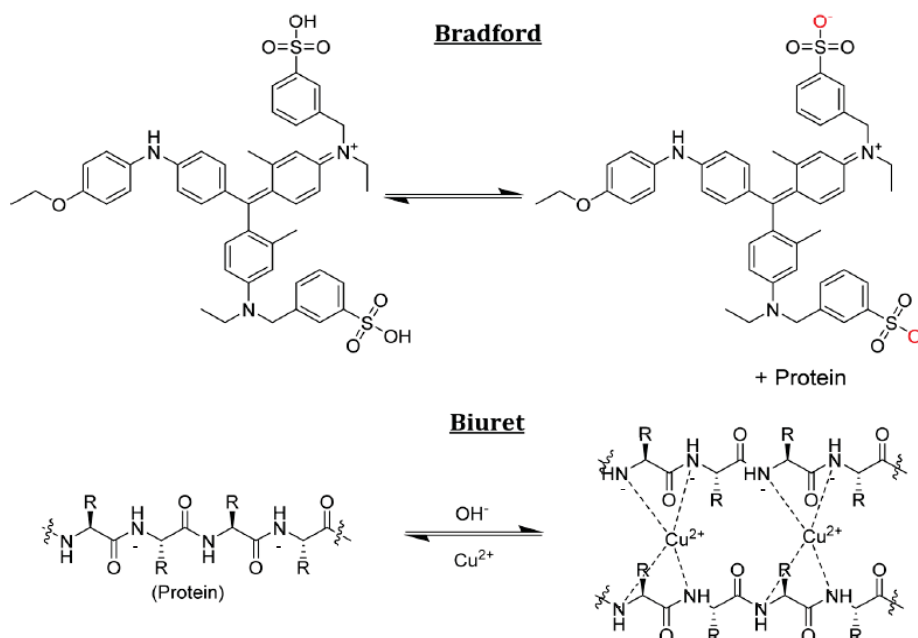
As extrações de proteínas comumente utilizam soluções alcalinas e/ou salinas para aumentar a eficiência da extração, principalmente em tecidos de origem animal (UPRETI; DAVIS; OLIVER, 1991; MUNASINGHE; SAKAI, 2004; KIM *et al.*, 2018). Mæhre *et al.* (2018) destaca que essa condição propicia alta eficiência de extração em tecido muscular. Keever 2012 relata que extrações em tecido muscular com 3.5% de NaCl resulta em ótimo rendimento. O sal permite aumentar a solubilidade das proteínas em solução por meio do efeito salting-in. Em contrapartida, a depender do objetivo pode ser necessário a dessalinização para prosseguir as etapas seguintes de separação, análise e/ou quantificação das proteínas (KIM *et al.*, 2018).

O extrato bruto de proteínas pode ser submetido a purificação por diferentes técnicas para reduzir o efeito dos interferentes, como a diálise, centrifugação, cromatografia de troca iônica e/ou líquida, eletroforese, precipitação ácida e posterior solubilização. Enquanto que a adaptação do método geralmente consiste em adicionar ou remover algum componente na preparação do reagente que resulte na melhora da reatividade, sensibilidade ou estabilidade do Coomassie brilliant blue BG-250 (Bradford) ou do complexo coordenado de Cu (II) (Biureto) (GORNALL; BARDAWILL; DAVID; ZAIA, 1949; FANGER, 1987; ZAIA; LICHTIG, 1998; BIANCHI-BOSISIO, 2005; COSKUN, 2016). Algumas modificações para o Bradford são: adição

de ácido perclórico, detergentes, tampões e a remoção de etanol. Para o Biureto: adição de tartarato de sódio, isopropanol, dicloroetano e peróxido de hidrogênio (1%) (GORNALL; BARDAWILL; DAVIDZIA, 1949; OWUSU-APENTEN, 2002).

Em resumo, o método de Bradford para dosagem de proteínas consiste na reação entre o composto Coomassie brilliant blue BG-250 (CBB) de cor vermelha ou castanha (forma catiônica) e os aminoácidos básicos (arginina, histidina, lisina e grupos amino terminal) e aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) das proteínas alterando a estrutura do composto para sua forma aniônica e resultando solução de cor azul (BRADFORD, 1976; MOORE, *et al.*, 2010; BRUNELLE, *et al.*, 2017). A sensibilidade do método é de 1 – 10 µg de proteína ou 5 µg/mL (BRADFORD, 1976). O método do Biureto consiste na formação de um complexo coordenado entre o Cu (II) com o par de elétrons do nitrogênio das ligações amidas de peptídeos e proteínas, alterando a cor da solução de azul para violeta (figura 23) (GORNALL; BARDAWILL; DAVIDZIA, 1949). A sensibilidade do teste é de 0.1 – 5.0 mg/mL (JANAÍRO, *et al.*, 2015).

Figura 23. Esquema químico para ensaio colorimétrico de proteína



FONTE: Gee *et al.* (2016).

Portanto, este trabalho teve por objetivos identificar e comparar o efeito de diferentes concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) em dosagens de proteínas utilizando o método de Bradford e Biureto e avaliar a curva de calibração em uma matriz.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As soluções estoque de albumina sérica humana (ASH) foram preparadas em soluções contendo água destilada, 0,5, 1, 2 ou 3,5% de NaCl. A concentração final foi de 200 µg/mL para o método de Bradford e 3 mg/mL para o método do Biureto. Em seguida, alíquotas foram retiradas e diluídas para obter concentrações de 0, 40, 80, 120, 160, 200 µg/mL para o método de Bradford e 0, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 2,4, 2,7 e 3 mg/mL, para o método de Biureto, exceto para água destilada, que foi 0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,7, 0,9 e 1 mg/mL.

Para avaliação dos cálculos de dosagens em amostras biológicas, foi utilizado a parede do corpo com musculatura de 20 pepinos-do-mar (*Holothuria grisea*). A extração de proteínas solúveis foi realizada segundo método descrito por Mæhre *et al.* (2018), com modificações. Em aproximadamente 100 mg da parede do corpo liofilizada e fragmentada, foi adicionado 4 mL da solução de 0,1 M hidróxido de sódio (NaOH) em 3,5% de cloreto de sódio (NaCl), pH 12. Em seguida, a amostra foi sonicada por 15 minutos e mantida à 60 °C, em agitação constante, por 90 minutos. Após o período determinado, a mistura foi novamente sonicada por 15 minutos, centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos à 4 °C, retirado o sobrenadante e armazenado. O resíduo foi lavado com 2 mL da solução de extração, vortexado por 10s e centrifugado por 15 minutos (DELIMA; TRIO, 2019). Os sobrenadantes foram combinados e liofilizados.

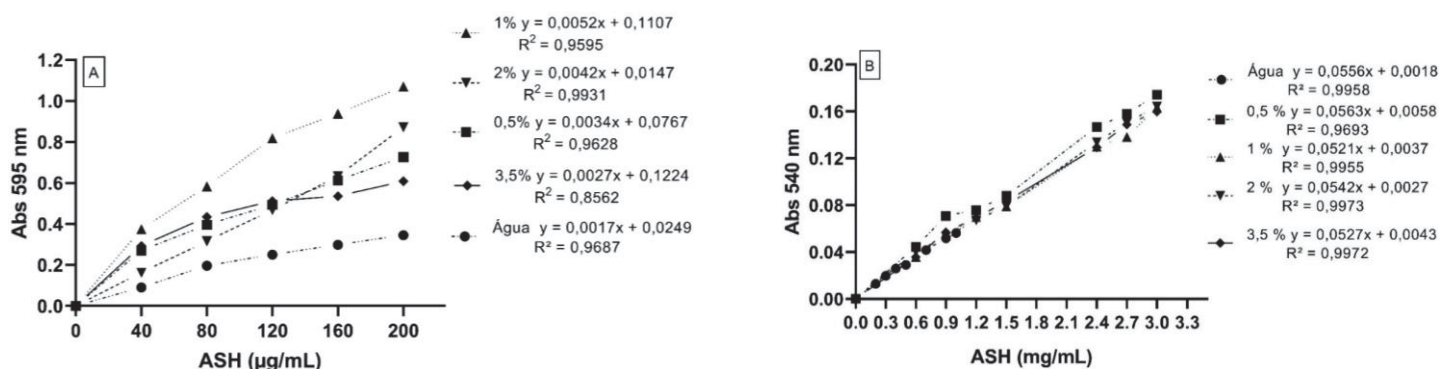
As amostras de tecido foram solubilizadas em 5 mL de água destilada para o teste do Biureto e em seguida foi retirada uma alíquota de 0,5 mL e diluída 10 vezes para o teste de Bradford. Foi seguido o protocolo padrão de microplaca para os dois ensaios colorimétricos (GORNALL; BARDAWILL; DAVID, 1949; BRADFORD, 1976). Em resumo, 50 µL das soluções estoque diluída, branco (solução de extração) e do extrato foram adicionados em diferentes poços da microplaca e em seguida adicionou-se 250 µL do reagente de Bradford (Sigma Aldrich) ou do reativo de Biureto. Agitou-se a microplaca levemente por 20 segs e esperou 15 minutos antes de realizar a leitura. As absorbâncias foram lidas em 595 nm e 540 nm para os respectivos métodos, Bradford e Biureto. O experimento foi realizado em triplicata.

As absorbâncias das amostras biológicas foram ajustadas utilizando a curva de calibração de 3.5 % NaCl para corresponder as condições de extração. Os dados foram submetidos a testes de Normalidade (Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) para avaliar o comportamento da distribuição das amostras e analisados de acordo com sua natureza, paramétrico (*t* de Student) ou não paramétrico (Mann Whitney) (MIOT, 2017). O gráfico box plot foi construído utilizando as seguintes condições: os limites superior e inferior são os valores mínimo e máximo com *outlier*, a linha e quadrado no intervalo interquartilico é a mediana e a média, respectivamente. Foi utilizado o *Software* GraphPad Prism®, versão 8.0.2 (263) para as análises estatísticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de calibração da ASH com diferentes concentrações de NaCl (0, 0.5, 1, 2 e 3.5%) estão apresentadas na figura 24. Ao lado de cada concentração está a equação de regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2). No método de Bradford foram identificadas diferenças consideráveis no coeficiente angular, variando de 0,01 a 0,05. No método de Biureto a variação na concentração de NaCl não afetou o coeficiente angular, mantendo-se em 0,05 em todas as curvas. A linha de regressão foi omitida para melhor visualização dos dados.

Figura 24. Curvas de calibração de ASH na presença de diferentes concentrações de NaCl. (A) Método de Bradford; (B) Método do Biureto



FONTE: O autor (2023)

Bradford (1976) quando propôs o seu método afirmou que os sais cloreto de magnésio (MgCl_2 , 1 M), cloreto de potássio (KCl, 1 M), cloreto de sódio (NaCl, 5 M) e sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 M) não interferiam no desenvolvimento da reação. Contudo, neste estudo foi observado que o uso de solução com 0.08 M de NaCl (0,5%) afetou a absorção espectrofotométrica e gerou uma curva de calibração significativamente diferente quando comparada com a água destilada (0% de NaCl). O aumento para concentração de 0.17 M (1%), 0.34 M (2%) e 0.6 M (3.5%) de NaCl também resultou em larga variação. Silvério *et al.* (2012) testou a interferência de diferentes sais, exceto cloreto de sódio, em concentrações de 0%, 0.5%, 1 % e 2% em um sistema aquoso bifásico para o método de Bradford. Eles observaram que concentrações acima de 0.5% causavam interferência significativa no método e que ao ultrapassar 1% a absorbância era reduzida. O mesmo foi observado neste estudo.

Uma possível explicação para esses resultados é o efeito conjunto entre a exposição dos grupos básicos da proteína pela adição de sal e a consequente interferência ao aumentar a concentração. A adição de sais em uma solução contendo proteínas aumenta a solubilidade por reduzir a interação proteína-proteína e aumentar a interação proteína-água (Salting-in) (MARFO; OKE, 1989; VOET; VOET; PRATT, 2014). Ro (2002) observou que ao aumentar a concentração de NaCl, a atividade de uma aminotransferase diminuiu juntamente com os valores de absorbância, efeito causado por mudança conformacional na enzima. Low e Somero (1975) explicam que os sais desfazem as esferas de hidratação ao redor da proteína afetando a organização da água e expõe a cadeia lateral dos aminoácidos.

Em estudo feito por Friedenauer e Berlet (1989) com baixas concentrações (0–0.5%) do detergente Triton X-100, foi observado aumento na intensidade de cor da reação e na sensibilidade. A explicação do efeito do Triton X-100 é similar ao dos sais, por ser um detergente não iônico, ele expõe grupos hidrofóbicos facilitando a formação do complexo CCB-proteína. Eles sugerem o uso do Triton X-100 como coadjuvante em ensaio com CCB para maximizar a sensibilidade sem invalidar o método, mas ressaltam que pode gerar erros analíticos em misturas heterogêneas de proteína, pois as soluções utilizadas como branco não compensam fidedignamente a subtração com a amostra.

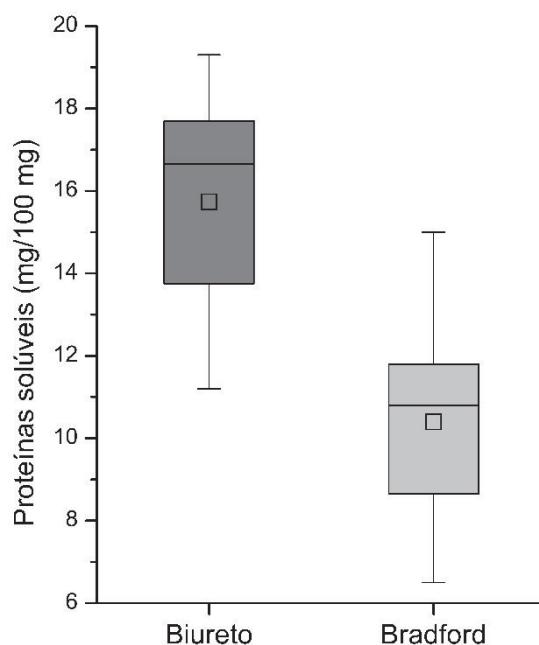
Portanto, a intensidade da cor gerada pelo CCB depende da composição, das propriedades físico-químicas, do tipo de solução em que as proteínas foram

solubilizadas e da disponibilidade dos grupos laterais (MOORE *et al.*, 2010). Desse modo, ao aumentar a concentração de sais houve a exposição dos grupos internos da ASH, maior reação com o CCB e melhora na sensibilidade (GEORGIOU *et al.*, 2008). Por outro lado, a continuidade na adição de sais diminui a solubilidade pela competição entre os íons solvatados e as proteínas (Salting-out), elas se agregam/precipitam, reduz a efetividade da formação do complexo CCB-proteína, reduzindo a sensibilidade e a absorbância (MARFO; OKE, 1989; VOET; VOET; PRATT, 2014)

Esse efeito não é observado no método Biureto pois ele interage com as ligações peptídicas e não com grupos específicos, causando variação desprezível entre as curvas de calibração. Logo, a exposição ou não dos grupos laterais não afeta a reação. Johnson e Swanson (JOHNSON; SWANSON, 1952) relatam que o aumento nas concentrações de NaCl e Na₂SO₄ interferiram apenas levemente na curva de calibração. Com isso, o método do Biureto apresenta-se adequado para estudos que utilizam condições salinas de extração. A limitação do método é a sensibilidade, que requer uma maior concentração de proteína do que o Bradford, por exemplo. Autores divergem entre qual dos dois é o melhor para determinar proteínas e cabe ao pesquisador avaliar e escolher o mais adequado para seu contexto amostral JENZANO *et al.*, 1986; SAPAN; LUNDBLAD; PRICE, 1999).

A análise estatística dos dados das amostras modelo submetidas aos testes colorimétricos apresentou distribuição normal, Shapiro-Wilk ($p = 0.721$ e $p = 0.214$) e Kolmogorov-Smirnov ($p > 0.100$). Então, foram submetidos ao teste t de *Student* resultando em diferença significativa, $p < 0.0001$. O método do Biureto apresentou média de 15.09 ± 2.5 mg e o Bradford 10.94 ± 2.60 mg. O tamanho da diferença entre as médias foi de $5.34 \pm 0,79$ mg a mais para o Biureto (figura 25). Devido o coeficiente de determinação (R^2) da curva de calibração do método do Biureto ser maior que a do método de Bradford nas condições de extração (3.5% NaCl) e, portanto, explicar melhor a variabilidade dos dados, este seria o método mais adequado para quantificar as proteínas. Dessa forma, experimentos que utilizem sais nas extrações e que não há dessalinização devem levar em conta esse fator.

Figura 25. Quantidade de proteínas solúveis em 100 mg da parede do corpo de espécimes de *Holothuria grisea* pelo método de Biureto e Bradford.



FONTE: O autor (2023)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de Bradford apesar de ser mais sensível a pequenas concentrações de proteína, foi significativamente afetado pela presença de cloreto de sódio (0.08 M). Inversamente, o método do Biureto foi o mais adequado. Assim, a escolha de qual método usar nas dosagens de proteínas deve ser feita com cautela para não gerar erros analíticos e dados equivocados. O tipo de matriz e as condições de extração são outros pontos a serem examinados e ajustados durante o planejamento dos experimentos, pois podem conter interferentes que afetam a dosagem espectrofotométrica

REFERÊNCIAS

BANIK, Samudra Prosad et al. Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 386, n. 1, p. 113-115, 2009.

BIANCHI-BOSISIO, A. Physiological Samples. **Encyclopedia of analytical Science**, p. 357-375, 2005.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNELLE, Erica et al. Coomassie brilliant blue G-250 dye: an application for forensic fingerprint analysis. **Analytical chemistry**, v. 89, n. 7, p. 4314-4319, 2017.

COMPTON, Steve J.; JONES, Clive G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

COSKUN, Ozlem. Separation techniques: chromatography. **Northern clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

DELIMA, David John Eliezar; TRIO, Phoebe. Method validation for protein quantitation of fish muscle tissues from Lake Taal, Batangas. **KIMIKA**, v. 30, n. 2, p. 5-16, 2019.

DOS SANTOS, Alessa Siqueira de Oliveira et al. Linearization of the bradford protein assay to application in cow milk proteins quantification by UV-Vis spectrophotometry method. **Journal of the Candido Tostes Dairy institute**, v. 69, p. 415-423, 2014.

FANGER, Bradford O. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 11-17, 1987.

FARIAS, Eliana et al. Comparison of two methods of tear sampling for protein quantification by Bradford method. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 261-264, 2013.

FRIEDENAUER, Susanne; BERLET, Hans H. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. **Analytical biochemistry**, v. 178, n. 2, p. 263-268, 1989.

GEORGIU, Christos D. et al. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, p. 391-403, 2008.

GORNALL, Allan G; BARDAWILL, Charles J.; DAVID, Maxima M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. biol. Chem**, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

JANAÍRO, Gerardo et al. Determination of the sensitivity range of biuret test for undergraduate biochemistry experiments. **e -Journal of Science & Technology (e-JST)**. 2015.

JENZANO, Joyce W. et al. Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 370-376, 1986.

JOHNSON, B. C; SWANSON, A. M. Milk serum proteins. 1. A quantitative biuret test for milk serum proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 35, p. 823-828, 1952.

KEEVER, Brianna. **Salt concentration and species affects protein extractability and processed meat characteristics**.. Tese de Doutorado. University of Illinois at Urbana-Champaign. 2012.

KIM, Hyun Kyung et al. Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 12-17, 2018.

LOW, Philip S.; SOMERO, George N. Activation volumes in enzymic catalysis: their sources and modification by low-molecular-weight solutes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 8, p. 3014-3018, 1975.

MÆHRE, Hanne K. et al. Protein determination—method matters. **Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2018.

MARFO, E. K.; OKE, O. L. Effect of sodium chloride, calcium chloride and sodium hydroxide on *Denolix regia* protein solubility. **Food chemistry**, v. 31, n. 2, p. 117-127, 1989.

MATTOO, Roshan L.; ISHAQ, Mohammad; SALEEMUDDIN, M. Protein assay by Coomassie brilliant blue G-250-binding method is unsuitable for plant tissues rich in phenols and phenolases. **Analytical biochemistry**, v. 163, n. 2, p. 376-384, 1987.

MIOT, Hélio Amante. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal vascular brasileiro**, v. 16, p. 88-91, 2017.

MOORE, Jeffrey C. et al. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 4, p. 330-357, 2010.

MUNASINGHE, D. M. S.; SAKAI, Tadashi. Sodium chloride as a preferred protein extractant for pork lean meat. **Meat science**, v. 67, n. 4, p. 697-703, 2004.

OWUSU-APENTEN, Richard. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. CRC press, 2002.

RO, Hyeon-Su. Effects of salts on the conformation and catalytic properties of d-amino acid aminotransferase. **BMB Reports**, v. 35, n. 3, p. 306-312, 2002.

SAPAN, Christine V.; LUNDBLAD, Roger L.; PRICE, Nicholas C. Colorimetric protein assay techniques. **Biotechnology and applied Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 99-108, 1999.

SAVORY, John; PU, Pin H.; SUNDERMAN JR, F. William. A biuret method for determination of protein in normal urine. **Clinical chemistry**, v. 14, n. 12, p. 1160-1171, 1968.

SILVÉRIO, Sara C. et al. Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method. **Analytical biochemistry**, v. 421, n. 2, p. 719-724, 2012.

UPRETI, G. C.; DAVIS, C.; OLIVER, J. Preparation of representative homogenates of biological tissues: effect of salt on protein extraction. **Analytical biochemistry**, v. 198, n. 2, p. 298-301, 1991.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica-: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaïs BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

REFERÊNCIA GERAL

ABUZAYTOUN, Reem *et al.* Unusual Ether Lipids and Branched Chain Fatty Acids in Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*) Viscera and Their Seasonal Variation. **Marine drugs**. v. 20, nº 435, 2022.

ABUZAYTOUN, Reem. Seasonal variation of lipid and carotenoid content of *Cucumaria frondosa* viscera oil and the development of methods for its quality control. Tese (Doutorado) - Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, 2017.

AHMED, H. O. *et al.* Biochemical composition of some Echinodermata (Holothuroidea, Echinoidea) from the Red Sea, Egypt. **Brazilian Journal of Biology**. v. 82, 2022.

ANDERSON, S. C; LOTZE, H. K; SHACKELL, N. L. Evaluating the knowledge base for expanding low trophic-level fisheries in Atlantic Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 2008.

ANTUN, Alex Elias; BALDIN, Nelma. Pegada Ecológica: percepção de crianças em caminhadas na natureza. **Revista Paranaense de Desenvolvimento-RPD**, v. 34, n. 124, p. 245-265, 2013.

APPLETON, Katherine M. *et al.* Sensory and physical characteristics of foods that impact food intake without affecting acceptability: Systematic review and meta-analyses. **Obesity reviews**, v. 22, n. 8, 2021.

ARDIANSYAH, A. *et al.* Fatty acid from sea cucumber: Mini review. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2022.

ATTIA, Youssef A. *et al.* Fatty acid and cholesterol profiles, hypocholesterolemic, atherogenic, and thrombogenic indices of broiler meat in the retail market. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, p. 1-11, 2017.

AYDIN, Mehmet *et al.* Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. **International journal of food science & technology**, v. 46, n. 3, p. 500-508, 2011.

AZAM, KHAIRUL; SINGH, JYANTI JYOTISHMA. Development of Value Added Products from Dried Sea Cucumber (*Holothuria scabra*). **Journal of Oceanography and Marine Research**. v. 1, n. 108, 2013.

BANDARANAYAKE, W. M.; ROCHER, A. Des. Role of secondary metabolites and pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. **Marine Biology**, v. 133, p. 163-169, 1999.

BANIK, Samudra Prosad et al. Interference of sugars in the Coomassie Blue G dye binding assay of proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 386, n. 1, p. 113-115, 2009.

BASTOS, Marcele Fontenelle. Efeitos do condroitim sulfato fucosilado na malária. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2011.

BECHTEL, Peter J. et al. Chemical composition of the giant red sea cucumber, *Parastichopus californicus*, commercially harvested in Alaska. **Food science & nutrition**, v. 1, n. 1, p. 63-73, 2013.

BENÍTEZ-VILLALOBOS, Francisco; AVILA-POVEDA, Omar Hernando; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, Itandehui Sarai. Reproductive biology of *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: holothuroidea) from Oaxaca, Mexico. **Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms**, v. 1, n. 1, p. 13-24, 2013.

BIANCHI-BOSISIO, A. Physiological Samples. **Encyclopedia of analytical Science**, p. 357-375, 2005.

BIANDOLINO, Francesca et al. Occurrence and patterns of nutritional traits and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sea cucumber (*Holothuria polii*) tissues: benefits and risk for human health. **Food Quality and Safety**, v. 6, 2022.

BINYON, John. **Physiology of echinoderms**. 1.ed.Canada: Editora Pergamon Press, 1972

BISHOP, Wendy Giamberardino. Projeto de intervenção de educação ambiental: conscientização para a preservação da restinga da orla de Guaratuba-PR. Relatório (Especialista em Educação Ambiental) Programa de Pós-graduação em Educação Ambiental com ênfase em Espaços Educadores Sustentáveis da Universidade Federal do Paraná, Matinhos, 2015.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 910–917, 1959.

BOLAND, Mike et al. Muscle proteins. **Encyclopedia of food chemistry**, p. 164-179, 2018.

BORDBAR, Sara; ANWAR, Farooq; SAARI, Nazamid. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. **Marine drugs**, v. 9, n. 10, p. 1761-1805, 2011.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNELLE, Erica et al. Coomassie brilliant blue G-250 dye: an application for forensic fingerprint analysis. **Analytical chemistry**, v. 89, n. 7, p. 4314-4319, 2017.

BUENO, Maristela de Lima *et al.* Gametogenesis and weight change of body organs of the sea cucumber *H (H) grisea* (Aspidochirotida: Holothuriidae) in Southern Brazil. **Revista de Biología Tropical**. v. 63, 2015.

BYRNE, M. *et al.* Reproduction in the diadematoïd sea urchin *Centrostephanus rodgersii* in contrasting habitats along the coast of New South Wales, Australia. **Marine Biology**, v. 132, n. 2, p. 305-318, 1998.

BYRNE, Maria; CERRA, Anna. Lipid dynamics in the embryos of Patiriella species (Asteroidea) with divergent modes of development. *Development Growth and Differentiation*, v. 42, n. 1, p. 79–86, 2000.

CHANG-LEE, Maria V.; PRICE, Robert J.; LAMPILA, Lucina E. Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus* spp.). **Journal of Food Science**, v. 54, n. 3, p. 567-568, 1989.

CHASANAHA, Ekowati *et al.* Fatty acid profile, carotenoid content, and in vitro anticancer Activity of Karimunjawa and Lampung sea cucumber. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 117-124, 2016.

CHEN, Shiguo *et al.* Sequence determination and anticoagulant and antithrombotic activities of a novel sulfated fucan isolated from the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1820, n. 7, p. 989-1000, 2012.

CHIU, Huai Hsuan; KUO, Ching Hua. Gas chromatography-mass spectrometry-based analytical strategies for fatty acid analysis in biological samples. **Journal of Food and Drug Analysis**.[S.l.]: Elsevier Taiwan LLC, 2020

COMPTON, Steve J.; JONES, Clive G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985.

CONAND, C. Commercial Sea cucumbers: a review for the Western Indian Ocean. **WIOMSA Book Series**. n.5, 2007.

CONAND, C. The fishery resources of Pacific Island countries. Part 2: Holothurians. **FAO Fisheries Technical Paper**. v. 2. n. 272. p. 143, 1989.

COSKUN, Ozlem. Separation techniques: chromatography. **Northern clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

COSTA, Paulo Bernardes da. Sobrevivência, crescimento e capacidade de reciclagem de matéria orgânica do pepino-do-mar *H (H) grisea* Selenka, 1867 (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida). Dissertação (Mestrado em aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – Florianópolis, SC, 2010.

DALSGAARD, Johanne *et al.* Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. **Advances in marine biology**. v. 46, p.225-340, 2003.

DAR, Mahmoud A.; AHMAD, Hamdy O. The feeding selectivity and ecological role of shallow water holothurians in the Red Sea. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 24, p. 11-21, 2006.

DAS, Undurti N. Essential fatty acids-a review. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 467-482, 2006.

DAVID, Frank *et al.* Food sources, digestive efficiency and resource allocation in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata: Holothuroidea): Insights from pigments and fatty acids. *Aquaculture Nutrition*, v. 26, n. 5, p. 1568–1583, 1 out. 2020.

DAVID, Frank *et al.* Sex-specific seasonal variations in the fatty acid and carotenoid composition of sea cucumber gonads and implications for aquaculture. **Marine Biology**, v. 170, n. 4, p. 47, 2023.

DEAN, Walter E. Determination of carbonate and organic matter in Calcareous sediments and sedimentary rocks by loss on ignition: comparison with other methods. **Journal of Sedimentary Research**. v.44, n. 1, p. 242-248, 1974.

DELIMA, David John Eliezar; TRIO, Phoebe. Method validation for protein quantitation of fish muscle tissues from Lake Taal, Batangas. **KIMIKA**, v. 30, n. 2, p. 5-16, 2019.

DELIMA, David John Eliezar; TRIO, Phoebe. Method validation for protein quantitation of fish muscle tissues from Lake Taal, Batangas. **KIMIKA**, v. 30, n. 2, p. 5-16, 2019.

DIAS, Ítala Farias. Distribuição Espaço-Temporal E Densidade Populacional De *H (H) grisea* (Holothuroidea: Aspidochirotida) Na Praia De Bitupitá, Ceará, Nordeste Do Brasil. 2012. 1–71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

DJAWDAN, Minou *et al.* Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster*. **Physiological Zoology**, v. 69, n. 5, p. 1176-1195, 1996.

DOMMES, Veronika; WIRTZ-PEITZ, Ferdinand; KUNAU, Wolf-H. Structure determination of polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry—a comparison of fragmentation patterns of various derivatives. **Journal of chromatographic science**, v. 14, n. 8, p. 360-366, 1976.

DONG, Yun-wei *et al.* Physiological responses in a variable environment: relationships between metabolism, hsp and thermotolerance in an intertidal-subtidal species. **PLoS One**, v. 6, n. 10, 2011.

DONG, Yunwei; DONG, Shuanglin; JI, Tingting. Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. **Aquaculture**, v. 275, n. 1-4, p. 329-334, 2008.

DOS SANTOS, Alessa Siqueira de Oliveira et al. Linearization of the bradford protein assay to application in cow milk proteins quantification by UV-Vis spectrophotometry method. **Journal of the Candido Tostes Dairy institute**, v. 69, p. 415-423, 2014.

DREWNOWSKI, Adam. Sensory Properties of Fats and Fat Replacements. **Nutrition reviews**. v.50, n.4, 1992.

DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, mar. 1956.

DWORJANYN, Symon A.; PIROZZI, Igor; LIU, Wenshan. The effect of the addition of algae feeding stimulants to artificial diets for the sea urchin *Tripneustes gratilla*. **Aquaculture**, v. 273, n. 4, p. 624-633, 2007.

EECKHAUT, Igor *et al.* In-vitro fertilisation: a simple, efficient method for obtaining sea cucumber larvae year round. *In: Asia–Pacific tropical sea cucumber aquaculture. Proceedings of an international symposium held in Noumea, New Caledonia.* ACIAR Proceedings. pp. 40-49, 2012.

ELVEVOLL, Edel Oddny *et al.* Food Safety Risks Posed by Heavy Metals and Persistent Organic Pollutants (POPs) related to Consumption of Sea Cucumbers. **Foods**, v. 11, n. 24, p. 3992, 2022.

ERIKSSON, Hampus *et al.* Contagious exploitation of marine resources. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 13, n. 8, p. 435-440, 2015.

EVERS, J. M.; HUGHES, C. G. Analysis. **Chemical Analysis**. 2002.

FANGER, Bradford O. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 11-17, 1987.

FARIAS, Eliana et al. Comparison of two methods of tear sampling for protein quantification by Bradford method. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 261-264, 2013.

FERGUSON, John Carruthers. Feeding, Digestion and Nutrition in Echinodermata. *In: FLORKIN, MARCEL; SCHEER, BRADLEY T. (Org.). Chemical Zoology.* London: Academic Press, p. 71-76, 1969.

FLOREN, Adonis S. *et al.* A review of factors influencing the seagrass-sea cucumber association in tropical seagrass meadows. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 696134, 2021.

FOGLIETTA, Luz M. *et al.* A maturity index for holothurians exhibiting asynchronous development of gonad tubules. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 303, n. 1, p. 19-30, 2004.

FRIEDENAUER, Susanne; BERLET, Hans H. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. **Analytical biochemistry**, v. 178, n. 2, p. 263-268, 1989.

GALASSO, Christian; CORINALDESI, Cinzia; SANSONE, Clementina. Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 96, 2017.

GAO, Fei *et al.* Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 27, n. 4, p. 714-722, 2009.

GAO, Fei; XU, Qiang; YANG, Hongsheng. Seasonal biochemical changes in composition of body wall tissues of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 29, n. 2, p. 252–260, 2011.

GAO, Fei; YANG, Hongsheng. Tissue Biochemistry. In: YANG, Hongsheng; HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie (Ed.). **The sea cucumber *Apostichopus japonicus*: history, biology and aquaculture**. Academic Press, 2015.

GAO, M. L. *et al.* Bacterial diversity in the intestine of sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 17, n. 1, p. 318-325, 2017.

GEE, Clifford T. *et al.* Quantifying protein concentrations using smartphone colorimetry: a new method for an established test. **Journal of chemical education**, v. 94, n. 7, p. 941-945, 2017.

GENG, Chenfan *et al.* Effect of acute salinity stress on ion homeostasis, Na⁺/K⁺-ATPase and histological structure in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **SpringerPlus**, v. 5, p. 1-17, 2016.

GEORGIU, Christos D. *et al.* Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 391, p. 391-403, 2008.

GHOBADYAN, Fatemah *et al.* An investigation of the macroscopic and microscopic characteristics of gonadal tubules in the sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Persian Gulf, Iran). **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 32, p. 6-14, 2012.

GIANASI, Bruno L. *et al.* Influence of diet on growth, reproduction and lipid and fatty acid composition in the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 7, p. 3413–3432, 1 jul. 2016.

GIL, A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 388-396, 2002.

GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, Mercedes *et al.* A new insight into the influence of habitat on the biochemical properties of three commercial sea cucumber species. **International Aquatic Research**, v. 10, n. 4, p. 361–373, 1 dez. 2018.

GORNALL, Allan G; BARDAWILL, Charles J.; DAVID, Maxima M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. biol. Chem**, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

GORNALL, Allan G; BARDAWILL, Charles J.; DAVID, Maxima M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. biol. Chem**, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.

GRAHAM, Erin R.; THOMPSON, Joseph T. Deposit-and suspension-feeding sea cucumbers (Echinodermata) ingest plastic fragments. **Journal of experimental marine biology and ecology**, v. 368, n. 1, p. 22-29, 2009.

GUIMARÃES, TLB. Determinação da cor do solo pela carta de munsell e por colorimetria. 2016. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia)-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília**, 2016.

GURR, Michael I. *et al.* **Lipids: biochemistry, biotechnology and health**. John Wiley & Sons, 2016.

HAMEL, Jean-François; HIMMELMAN, John H.; DUFRESNE, Louise. Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). **The Biological Bulletin**, v. 184, n. 2, p. 125-143, 1993.

HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in temperate areas of the Northern Hemisphere. In **V. Toral-Granda, A. Lovatelli and M. Vasconcellos (eds). Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper**. n. 516, 2008.

HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie. Studies on the reproductive biology of the Atlantic sea cucumber *Cucumaria frondosa*. **SPC bêche-de-mer Information Bulletin**, v. 8, p. 22-33, 1996.

HANSEN, Malene; FLATT, Thomas; AGUILANIU, Hugo. Reproduction, fat metabolism, and life span: what is the connection?. **Cell metabolism**, v. 17, n. 1, p. 10-19, 2013.

HASEGAWA, Natsuki *et al.* Fatty acid composition in sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed with microbially degraded dietary sources. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 12, p. 2021-2031, 2014.

HEIRI, Oliver; LOTTER, André F; LEMCKE, Gerry. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. **Journal of paleolimnology**. v. 25, n. 1, p. 101-110, 2001.

HENDRY, G. A. F. Natural pigments in biology. In: **Natural food colorants**. Boston, MA: Springer US, p. 1-39, 1996.

HEY, C. D.; STAINSBY, G. The enhanced solubility of collagen following alkaline treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 97, n. 2, p. 364-366, 1965.

HO, Chuan-Kai; PENNING, Steven C. Consequences of omnivory for trophic interactions on a salt marsh shrub. **Ecology**, v. 89, n. 6, p. 1714-1722, 2008.

HOEGH-GULDBERG, O.; EMLET, R. B. Energy use during the development of a lecithotrophic and a planktotrophic echinoid. **The Biological Bulletin**, v. 192, n. 1, p. 27-40, 1997.

HUANG, Ning *et al.* The depolymerized fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber potently inhibits HIV replication via interfering with virus entry. **Carbohydrate Research**. 2013.

HUDSON, Ian R. *et al.* Seasonality and selectivity in the feeding ecology and reproductive biology of deep-sea bathyal holothurians. **Progress in Oceanography**. v. 59, 2003.

HUDSON, Ian R. *et al.* Temporal variations in fatty acid composition of deep-sea holothurians: evidence of benthic-pelagic coupling. **Marine Ecology Progress Series**, v. 281, p. 109-120, 2004.

IBRAHIM, Mona Y. *et al.* The Proximate Composition and the Nutritional Value of Some Sea Cucumber Species Inhabiting the Sudanese Red Sea. **Food Science and Quality Management**. v.41, 2015.

ICHIHARA, Ken'ichi; FUKUBAYASHI, Yumeto. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*, v. 51, n. 3, p. 635–640, 1 mar. 2010.

JANAÍRO, Gerardo *et al.* Determination of the sensitivity range of biuret test for undergraduate biochemistry experiments. **e -Journal of Science & Technology (e-JST)**. 2015.

JENZANO, Joyce W. *et al.* Comparison of five techniques for the determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical biochemistry**, v. 159, n. 2, p. 370-376, 1986.

Jl, Tingting; DONG, Yunwei; DONG, Shuanglin. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: aestivation and temperature. **Aquaculture**, v. 283, n. 1-4, p. 180-187, 2008.

JIANG, Hui *et al.* Chasing relationships between nutrition and reproduction: A comparative transcriptome analysis of hepatopancreas and testis from *Eriocheir sinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 4, n. 3, p. 227-234, 2009.

JOHNSON, B. C; SWANSON, A. M. Milk serum proteins. 1. A quantitative biuret test for milk serum proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 35, p. 823-828, 1952.

JÖNSSON, K. Ingemar. Capital and income breeding as alternative tactics of resource use in reproduction. **Oikos**, p. 57-66, 1997.

JØRGENSEN, N.O.G. Carbohydrates. *In: Encyclopedia of inland waters*. Thomas Mehner (Ed.). Academic Press, 2009.

KANG, Hee-Kyoung; SEO, Chang Ho; PARK, Yoonkyung. The Effects of Marine Carbohydrates and Glycosylated Compounds on Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**. v.16, n. 3, p. 6018-6056, 2015.

KASAI, Takamasa. Lipid contents and fatty acid composition of total lipid of sea cucumber *Stichopus japonicus* and Konowata (salted sea cucumber entrails). **Food Science and Technology Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2003.

KAUTSARI, N. *et al.* Effect of temperature increase on gametes release of *Holothuria scabra*. **AACL Bioflux**, v. 13, n. 4, p. 2375-2387, 2020.

KEEVER, Brianna. **Salt concentration and species affects protein extractability and processed meat characteristics..** Tese de Doutorado. University of Illinois at Urbana-Champaign. 2012.

KEEVER, Brianna. **Salt concentration and species affects protein extractability and processed meat characteristics..** Tese de Doutorado. University of Illinois at Urbana-Champaign. 2012.

KERSTEN, Sander. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. **EMBO reports**, v. 2, n. 4, p. 282-286, 2001.

KHOTIMCHENKO, Yu S. The Nutritional Value of Holothurians. **Russian Journal of Marine Biology**. v. 41, n. 6, 2015.

KHOTIMCHENKO, Yuri. Pharmacological potential of sea cucumbers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1342, 2018.

KIM, Hyun Kyung *et al.* Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium. **Food and Bioproducts Processing**, v. 108, p. 12-17, 2018.

KINCH, J *et al.* Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in the Western Central Pacific. In: TORAL-GRANDA, V.; LOVATELLI, A.; VASCONCELLOS, M. (Org.). Sea Cucumbers. A Global Review of Fisheries and Trade. Rome: FAO Fisheries and Aquaculture, v. 5, p. 7–55, 2008.

KRISHNAN, S. Histochemical studies on reproductive and nutritional cycles of the holothurian, *Holothuria scabra*. **Marine Biology**, v. 2, n. 1, p. 54-65, 1968.

KÜHNHOLD, Holger *et al.* Temperature-induced aerobic scope and Hsp70 expression in the sea cucumber *Holothuria scabra*. **Plos one**, v. 14, n. 3, 2019.

KÜHNHOLD, Holger *et al.* Thermal stress effects on energy resource allocation and oxygen consumption rate in the juvenile sea cucumber, *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833). **Aquaculture**, v. 467, p. 109-117, 2017.

KÜNILI, Ibrahim Ender; ÇOLAKOĞLU, Fatma Arik. Chemical and Nutritional Characteristics of *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788); A Seasonally Comparative Study. **Journal of aquatic food product technology**. 2019.

LEITE-CASTRO, Liliane Veras *et al.* Reproductive biology of the sea cucumber *H (H) grisea* in Brazil: importance of social and environmental factors in breeding coordination. *Marine Biology*, v. 163, n. 3, 1 mar. 2016.

LEVITAN, Don R. Optimal egg size in marine invertebrates: theory and phylogenetic analysis of the critical relationship between egg size and development time in echinoids. *The American Naturalist*, v. 156, n. 2, p. 175-192, 2000.

LI, Shanni *et al.* Structural characterization and anticoagulant analysis of the novel branched fucosylated glycosaminoglycan from sea cucumber *Holothuria nobilis*. *Carbohydrate Polymers*, v. 269, 2021.

LIAO, Ming-Ling *et al.* Effects of dietary lipid level on growth performance, body composition and digestive enzymes activity of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture Research*, v. 48, n. 1, p. 92-101, 2017.

LIU, Feng *et al.* Biochemical composition of the Australasian sea cucumber, *Australostichopus mollis*, from a nutritional point of view. *Nutrire*. v.42, n.12, 2017.

LOW, Philip S.; SOMERO, George N. Activation volumes in enzymic catalysis: their sources and modification by low-molecular-weight solutes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 72, n. 8, p. 3014-3018, 1975.

LOWE, Edgar F.; LAWRENCE, John M. Absorption efficiencies of *Lytechinus variegatus* (Lamarck)(Echinodermata: Echinoidea) for selected marine plants. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 21, n. 3, p. 223-234, 1976.

MÆHRE, Hanne K. *et al.* Protein determination—method matters. *Foods*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2018.

MÆHRE, Hanne K. *et al.* Protein determination—method matters. *Foods*, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2018.

MAKOVICKÝ, P.; JÍLEK, F. Short review of some properties of muscular proteins. *Ceskoslovenska Fysiologie*, v. 57, n. 1, p. 10-14, 2008.

MAOKA, Takashi. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of natural medicines*, v. 74, n. 1, p. 1-16, 2020.

MARFO, E. K.; OKE, O. L. Effect of sodium chloride, calcium chloride and sodium hydroxide on *Denolix regia* protein solubility. *Food chemistry*, v. 31, n. 2, p. 117-127, 1989.

MARQUET, Nathalie *et al.* Sea cucumbers, *Holothuria arguinensis* and *H. mammata*, from the southern Iberian Peninsula: variation in reproductive activity between populations from different habitats. *Fisheries Research*, v. 191, p. 120-130, 2017.

MARTIN, Joan Stadler. Studies on assimilation, mobilization, and transport of lipids by the fat body and haemolymph of *Pyrrhocoris apterus*. *J. Insect Physiol*, v. 15, p.2319-2344, 1969

MATSUNO, T. *et al.* Gonadal pigment of sea-cucumber (Holothuria leucospilota Brandt). **Experientia**, v. 25, n. 12, p. 1253-1253, 1969.

MATSUNO, Takao; TSUSHIMA, Miyuki. Comparative biochemical studies of carotenoids in sea cucumbers. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 111, n. 4, p. 597-605, 1995.

MATTOO, Roshan L.; ISHAQ, Mohammad; SALEEMUDDIN, M. Protein assay by Coomassie brilliant blue G-250-binding method is unsuitable for plant tissues rich in phenols and phenolases. **Analytical biochemistry**, v. 163, n. 2, p. 376-384, 1987.

MAYER, Lawrence M. The nature and determination of non-living sedimentary organic matter as a food source for deposit feeders. In: **Ecology of marine deposit feeders**. Springer New York, p. 98-113, 1989.

MCCURRY, J. D. GC analysis of total fatty acid methyl esters (FAME) and methyl linolenate in biodiesel using the revised EN14103: 2011 method. **Agilent Technologies Inc., USA**, 2012.

MENG, Xian-liang *et al.* Mortality of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, exposed to acute salinity decrease and related physiological responses: osmoregulation and heat shock protein expression. **Aquaculture**, v. 316, n. 1-4, p. 88-92, 2011.

MIOT, Hélio Amante. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal vascular brasileiro**, v. 16, p. 88-91, 2017.

MIOT, Hélio Amante. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **Jornal vascular brasileiro**, v. 16, p. 88-91, 2017.

MJØS, Svein A. The prediction of fatty acid structure from selected ions in electron impact mass spectra of fatty acid methyl esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 8, p. 550-560, 2004.

MONDOL, Muhammad Abdul Mojid *et al.* Sea Cucumber Glycosides: Chemical Structures, Producing Species and Important Biological Properties. **Marine drugs**. v. 15, n. 317, 2017.

MONROIG, Óscar; TOCHER, Douglas R.; NAVARRO, Juan C. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. **Marine drugs**, v. 11, n. 10, p. 3998-4018, 2013.

MOORE, Jeffrey C. *et al.* Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 4, p. 330-357, 2010.

MOORE, Jeffrey C. *et al.* Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 4, p. 330-357, 2010.

MUNASINGHE, D. M. S.; SAKAI, Tadashi. Sodium chloride as a preferred protein extractant for pork lean meat. **Meat science**, v. 67, n. 4, p. 697-703, 2004.

MUTHIGA, N. A.; KAWAKA, J. A. The breeding pattern and variations in timing and reproductive output of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in Kenya. **Western Indian Ocean Journal of Marine Science**, v. 8, n. 2, 2009.

NAVARRO, Pablo G.; GARCIA-SANZ, Sara; TUYA, Fernando. Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). **Scientia Marina**, v. 76, n. 4, p. 741-752, 2012.

NETO, Renato R. *et al.* The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 53, n. 3, p. 516-527, 2006.

OCHIEWO, Jacob *et al.* Socio-economic features of sea cucumber fisheries in southern coast of Kenya. **Ocean & Coastal Management**, v. 53, n. 4, p. 192-202, 2010.

OEDJOE, Marcelien Dj Ratoe. Composition of Nutritional Content of Sea Cucumbers (Holothuroidea) in Mania Waters, Sabu Raijua Regency, East Nusa Tenggara. **Journal of Aquaculture Research & Development**. v. 08, n. 07, 2017.

OMAR, H. A. *et al.* Reproductive periodicity of sea cucumber *Bohadschia vitiensis* (Echinodermata: Holothuroidea) in Hurghada area, Red Sea, Egypt. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 2, p. 115-123, 2013.

OWUSU-APENTEN, Richard. **Food protein analysis: quantitative effects on processing**. CRC press, 2002.

PANGESTUTI, Ratih; ARIFIN, Zainal. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. 2017.

PARANÁ. Prefeitura de Guaratuba. *Análise Temática Integrada – PARTE 1. Revisão do Plano Diretor de Guaratuba – PR*. Paraná: Prefeitura de Guaratuba, 2011. Acesso em: 05 de dezembro de 2022. Disponível em: http://portal.guaratuba.pr.gov.br/planodiretor/P2-AnaliseTematicaIntegrada-Parte1_vfinal5.pdf

PAWSON, David L. *et al.* Echinodermata of the Gulf of Mexico. **Gulf of Mexico: origin, waters, and biota**, v. 1, p. 1177-1204, 2009.

PAWSON, David L.; PAWSON, Doris J.; KING, Rachael A. A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). **Zootaxa**, v. 2449, n. 1, p. 1–48-1–48, 2010.

PEREIRA, Vanessa Alves. CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL, MORFOLÓGICA E GENÉTICA DO SEXO EM PEPINO-DO-MAR *H (H) grisea* (Selenka, 1987) NO NORDESTE DO BRASIL. 2017. 1–79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2017.

PERRY, G. J. *et al.* Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. **Geochimica et cosmochimica acta**, v. 43, n. 11, p. 1715-1725, 1979.

PETERS-DIDIER, Josefina *et al.* Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Athyonidium chilensis* (Holothuroidea: Dendrochirotida) in southern Chile. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 98, n. 2, p. 311-323, 2018.

PHAN, V. N. *et al.* Estudo bioenergetico de animais marinhos costeiros. 1. *Paralichthys brasiliensis* (perciformes, sciaenidae). **Programa e Resumos**. n.10, 199-213, 1993.

POMIN, Vitor H. Holothurian Fucosylated Chondroitin Sulfate. **Marine drugs**. v. 12, 2014.

PONTE, Isabela de Abreu Rodrigues. A pesca, processamento artesanal e qualidade microbiológica do produto final do pepino-do-mar *H (H) grisea* selenka, 1867 (echinodermata: holothuroidea) no extremo litoral oeste do ceará. 2017. 1–72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

PROWSE, T. A. A.; SEWELL, M. A.; BYRNE, M. Fuels for development: evolution of maternal provisioning in asterinid sea stars. **Marine Biology**, v. 153, p. 337-349, 2008.

PROWSE, Thomas AA *et al.* Long-term storage lipids and developmental evolution in echinoderms. **Evolutionary Ecology Research**, v. 11, n. 7, p. 1069-1083, 2009.

PURCELL, Steven W. *et al.* Ecological roles of exploited sea cucumbers. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**. v. 54, 2016.

PURCELL, Steven W. Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. Rome: FAO, 2010.

PURCELL, Steven W. **Processing sea cucumbers into beche-de-mer: A manual for Pacific Island fishers**. 2014.

PURCELL, Steven W.; WILLIAMSON, David H.; NGALUAFE, Poasi. Chinese market prices of beche-de-mer: Implications for fisheries and aquaculture. **Marine Policy**, v. 91, p. 58-65, 2018.

RAHANTOKNAM, Santi Penina Tua. Maturity gonad sea cucumber *Holothuria scabra* under the month cycle. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2017.

RAMOFAFIA, C.; BYRNE, M.; BATTAGLENE, C. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. **Marine Biology**, v. 142, p. 281-288, 2003.

RAMOFAFIA, Christain; BYRNE, Maria. Assessment of the 'tubule recruitment model'in three tropical Aspidochirote holothurians. **SPC Beche-de-Mer Information Bulletin**, v. 15, p. 13-16, 2001.

RASOLOFONIRINA, Richard *et al.* Reproductive Cycle of Edible Echinoderms from the Southwestern Indian Ocean II. The Ssandfish *Holothuria scabra* (Jaeger,

1833). **Western Indian Ocean Journal of Marine Science**, v. 4, n. 1, p. 61-76, 2005.

RASYID, Abdullah *et al.* Evaluation of nutritional value of sea cucumber *Holothuria scabra* cultured in Bali, Indonesia. **AACL Bioflux**, v. 13, n. 4, 2020.

RINGØ, E. Z. Z. V. *et al.* Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story?. **Aquaculture nutrition**, v. 22, n. 2, p. 219-282, 2016.

RO, Hyeon-Su. Effects of salts on the conformation and catalytic properties of d-amino acid aminotransferase. **BMB Reports**, v. 35, n. 3, p. 306-312, 2002.

ROBERTS, David. Deposit-feeding mechanisms and resource partitioning in tropical holothurians. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 37, n. 1, p. 43-56, 1979.

ROCHA-SANTOS, Teresa; DUARTE, Armando C. Introduction to the analysis of bioactive compounds in marine samples. In: **Comprehensive Analytical Chemistry**. Elsevier, p. 1-13, 2014..

RODRIGUES, Bruna Leal *et al.* Fatty acid profiles of five farmed Brazilian freshwater fish species from different families. **PLoS One**, v. 12, n. 6, 2017.

ROGGATZ, Christina C. *et al.* A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). **Natural product research**, v. 32, n. 1, p. 116-120, 2017.

ROGGATZ, Christina C. *et al.* First report of the nutritional profile and antioxidant potential of *Holothuria arguinensis*, a new resource for aquaculture in Europe. **Natural product research**, v. 30, n. 18, p. 2034-2040, 2015.

ROSENZWEIG, Rina *et al.* The Hsp70 chaperone network. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 20, n. 11, p. 665-680, 2019.

SAITO, M. *et al.* Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). **Journal of food science**, v. 67, n. 4, p. 1319-1322, 2002.

SALARZADEH, Ali Reza *et al.* Proximate composition of two sea cucumber species *Holothuria pavra* and *Holothuria arenicola* in Persian Gulf. **Annals of Biological Research**, v. 3, n. 3, p. 1305-1311, 2012.

SANTANA FILHO, Arquimedes Paixão de. Análise metabolômica de linhagens de melanócitos e melanomas de origem humana e murina. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, 2013.

SANTOS, Katharine Raquel Pereira dos *et al.* Manual de técnica histológica de rotina e de colorações. Universidade Federal de Pernambuco. 32 p., 2021.

SANTOS, Rita *et al.* Sea cucumber *Holothuria forskali*, a new resource for aquaculture? Reproductive biology and nutraceutical approach. **Aquaculture research**, v. 47, n. 7, p. 2307-2323, 2016.

SAPAN, Christine V.; LUNDBLAD, Roger L.; PRICE, Nicholas C. Colorimetric protein assay techniques. **Biotechnology and applied Biochemistry**, v. 29, n. 2, p. 99-108, 1999.

SAVORY, John; PU, Pin H.; SUNDERMAN JR, F. William. A biuret method for determination of protein in normal urine. **Clinical chemistry**, v. 14, n. 12, p. 1160-1171, 1968.

SCREMIN, Renata; FURQUIM, Suelen; DUBIASKI-SILVA, Janete. Fatores determinantes na distribuição de *Bunodosoma caissarum* Corrêa in Belém, 1987 (Cnidaria, Actiniaria) em um costão rochoso na costa sudeste do Brasil. **Estudos de Biologia**, v. 35, n. 85, 2013.

SETIAWATI, Ketut Maha *et al.* Growth and reproduction performance of sea cucumber (*Stichopus* sp.) fed with different feed regime. In: **E3S Web of Conferences**. EDP Sciences, 2021.

SILVÉRIO, Sara C. *et al.* Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method. **Analytical biochemistry**, v. 421, n. 2, p. 719-724, 2012.

SLATER, Matthew; CHEN, Jiaxin. Sea cucumber biology and ecology In: **Echinoderm Aquaculture. New Jersey: Wiley-Blackwell**, p. 47-56, 2015.

SMILEY, Scott. The dynamics of oogenesis and the annual ovarian cycle of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea). **The Biological Bulletin**, v. 175, n. 1, p. 79-93, 1988.

SOIL SURVEY DIVISION STAFF. Soil Conservation Service. U. S. Department of Agriculture Handbook 18. **Soil survey manual**. 2017.

SOMERO, George N. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 4, p. 780-789, 2002.

SROYRAYA, Morakot *et al.* Nutritional components of the sea cucumber *Holothuria scabra*. **Functional Foods in Health and Disease**. v.7, n.3, 2017.

STICKLE, William B.; AHOKAS, Robert. The effects of tidal fluctuation of salinity on the perivisceral fluid composition of several echinoderms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 47, n. 2, p. 469-476, 1973.

SUN, Guo-Quan *et al.* Two new cytotoxic nonsulfated pentasaccharide holostane (= 20-hydroxy lanostan-18-oic acid γ -lactone) glycosides from the sea cucumber *H. (H) grisea*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 91, n. 8, p. 1453-1460, 2008.

SUN, Jiamin *et al.* Effect of water temperature on diel feeding, locomotion behaviour and digestive physiology in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 9, p. jeb177451, 2018.

SUN, Jiamin *et al.* Growth, health and biochemical composition of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* after multi-year holding in effluent Waters of land-based salmon culture. **Aquaculture environment interactions**. v.12, 2020.

SUSETYA, I. E. *et al.* Characteristics of environment and habitat of sea cucumbers in Pane Island, Tapanuli Tengah Regency. **IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science**. v. 454, 2020.

SVETASHEV, V. I. *et al.* Lipid and fatty acid composition of holothurians from tropical and temperate waters. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 98, n. 4, p. 489-494, 1991.

SWANSON, Danielle; BLOCK, Robert; MOUSA, Shaker A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. **Advances in nutrition**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2012.

TAGHON, Gary L. Modeling deposit feeding. In: **Ecology of marine deposit feeders**. Springer New York, p. 223-246, 1989.

TAKEMAE, Nobuhiro; NAKAYA, Fumio; MOTOKAWA, Tatsuo. Low oxygen consumption and high body content of catch connective tissue contribute to low metabolic rate of sea cucumbers. **The Biological Bulletin**, v. 216, n. 1, p. 45-54, 2009.

TAMORI, Masaki; TAKEMAE, Chigusa; MOTOKAWA, Tatsuo. Evidence that water exudes when holothurian connective tissue stiffens. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 11, p. 1960-1966, 2010.

TANIKAWA, Eiichi; AKIBA, Minoru; YOSHITANI, Setsuko. Studies on the nutritive value of the meat of sea cucumber (*stichopus japonicus* selenka). **Bulletin of the faculty of fisheries hokkaido university**.v.5, n.4, 1955.

TAVARES, Y. A. G.; BORZONE, C. A. Reproductive cycle of *Mellita quinquiesperforata* (Leske) (Echinodermata, Echinoidea) in two contrasting beach environments. **Rev. Bras. Zool.**, v. 23, p: 573-580, 2006.

TAVARES, Yara A. G. *et al.* Citometría y los eventos de la oogénesis de *H (H) grisea* Selenka, 1867 en el sur de Brasil: subsidios para el cultivo. **Libro de Resúmenes V Congreso Latinoamericano de Equinodermos**. 2022

TEHRANIFARD, Akram *et al.* Reproductive cycle of *Stichopus herrmanni* from Kish Island, Iran. **SPC Beche-de-mer Information Bulletin**, v. 24, p. 22-27, 2006.

THOMPSON, R. J. The relationship between food ration and reproductive effort in the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. **Oecologia**, v. 56, n. 1, p. 50-57, 1982.

TOLON, Mustafa Tolga; ENGIN, Serhat. Gonadal development of the holothurian *Holothuria polii* (Delle Chiaje, 1823) in spawning period at the Aegean Sea (Mediterranean Sea). **Ege Journal of Fisheries & Aquatic Sciences (EgeJFAS)/Su Ürünleri Dergisi**, v. 36, n. 4, 2019.

UPRETI, G. C.; DAVIS, C.; OLIVER, J. Preparation of representative homogenates of biological tissues: effect of salt on protein extraction. **Analytical biochemistry**, v. 198, n. 2, p. 298-301, 1991.

USTYUZHANINA, Nadezhda E. *et al.* Fucosylated Chondroitin Sulfates from the Sea Cucumbers *Paracaudina chilensis* and *Holothuria hilla*: Structures and Anticoagulant Activity. **Marine drugs**, v. 18, n. 540, 2020.

UTHICKE, Sven; KAREZ, Rolf. Sediment patch selectivity in tropical sea cucumbers (Holothurioidea: Aspidochirotida) analysed with multiple choice experiments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 236, n. 1, p. 69-87, 1999.

VENÂNCIO, Eliana *et al.* Reproductive biology of the Sea cucumber *Holothuria mammata* (Echinodermata: Holothuroidea). **Biology**, v. 11, n. 5, p. 622, 2022.

VERGARA, Wensy; RODRÍGUEZ, Adriana. Nutritional Composition of Sea Cucumber *Isostichopus sp.* **Natural Resources**, v. 7, n. 03, p. 130, 2016.

VIDOLIN, Denilton; SANTOS-GOUVEA, Ivonete A.; FREIRE, Carolina A. Osmotic stability of the coelomic fluids of a sea-cucumber (*H. (H) grisea*) and a starfish (*Asterina stellifera*)(Echinodermata) exposed to the air during low tide: a field study. **Acta Biológica Paranaense**, v. 31, n. 1, p. 2, 2002.

VILLINSKI, Jeffrey T. *et al.* Convergent maternal provisioning and life-history evolution in echinoderms. **Evolution**, v. 56, n. 9, p. 1764-1775, 2002.

VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica-: A Vida em Nível Molecular**. Artmed Editora, 2014.

WANG, Yanchao *et al.* Investigation of structural proteins in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) body wall. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18744, 2020.

WEN, Jing; HU, Chaoqun; FAN, Sigang. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 14, p. 2469-2474, 2010.

WIEDEMEYER, Winfried L. Feeding behaviour of two tropical holothurians, *Holothuria scabra* and *H. atra* from Okinawa, Japan. **Proceedings of the Seventh International Coral Reef Symposium**. Guam, v. 2, 1992.

WULANDARI, Diah Anggraini; SYAHPUTRA, Gita; PUTRA, Masteria Yunovilsa. The Bioactive Compound and Mechanism of Action of Sea Cucumber (Holothuridae) As Anticancer: A Review. **J. Pure App. Chem. Res.** v.9, n. 3, 2020.

XIA, Sudong *et al.* Feeding preferences of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) on various seaweed diets. **Aquaculture**, v. 344, p. 205-209, 2012.

XU, Qinzeng *et al.* Fatty acid component in sea cucumber *Apostichopus japonicus* from different tissues and habitats. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 96, n. 1, p. 197-204, 2016.

YAHYAVI, Maziar *et al.* Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilata* from Qeshm Island (Persian Gulf). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n.12, 2012.

YANG, Hongsheng *et al.* Effects of body size and water temperature on food consumption and growth in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) with special reference to aestivation. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1085-1092, 2005.

ZAGURI, Moshe *et al.* Protein quantification in ecological studies: a literature review and empirical comparisons of standard methodologies. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1240-1251, 2020.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaïs BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZEUGOLIS, D. I. *et al.* Collagen solubility testing, a quality assurance step for reproducible electro-spun nano-fibre fabrication. A technical note. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 19, n. 10, p. 1307-1317, 2008.

ZHANG, Kai *et al.* Effects of heat treatment on the gel properties of the body wall of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). **Journal of food science and technology**, v. 54, p. 707-717, 2017.

ZHANG, M. *et al.* The new drying technology of sea cucumber. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2021.

ZHANG, Shuangyan *et al.* Examination of sex-related differences in intestinal and gonadal lipid metabolism in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Aquaculture**, v. 562, p. 738787, 2023.

ZHAO, Heling; CHEN, Muyan; YANG, Hongsheng. Albinism. In: YANG, Hongsheng; HAMEL, Jean-François; MERCIER, Annie (Ed.). **The sea cucumber *Apostichopus japonicus*: history, biology and aquaculture**. Academic Press, 2015.

ZHENG, Wenqi *et al.* Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of the polysaccharides from sea cucumber *Pattalus mollis*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, p. 198, 2019.

ZHONG, Ying; KHAN, Muhammad Ahmad; SHAHIDI, Fereidoon. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 4, p. 1188-1192, 2007.

ZHUKOVA, Natalia V. Fatty Acids of Echinoderms: Diversity, Current Applications and Future Opportunities. **Marine Drugs**, v. 21, n. 1, p. 21, 2022.

ZMEMLIA, N. *et al.* Biochemical composition and antioxidant potential of the edible Mediterranean sea cucumber *Holothuria tubulosa*. **Grasas y aceites**, v. 71, n.3, 2020.