

## Atividade antioxidante em hidrolisados de pele de rã touro

### ANTIOXIDATING ACTIVITY IN FROG SKIN HYDROLISATES

#### RESUMO

**Juliana Aparecida Mirante da Silva**  
[Juliana\\_mirante@hotmail.com](mailto:Juliana_mirante@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Solange Maria Cottica**  
[smcottica@utfpr.edu](mailto:smcottica@utfpr.edu)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Vinicius Pinheiro**  
[vini\\_2015\\_pinheiro@hotmail.com](mailto:vini_2015_pinheiro@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

**Ortência L. G. S. Nunes**  
[ortencianunes@yahoo.com.br](mailto:ortencianunes@yahoo.com.br)  
Pós-doutoranda do PPG em Recursos Pesqueiros da Universidade NIOESTE-TD  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil

O projeto teve como objetivo a utilização de um resíduo de indústria, o qual se tem conhecimento pelo uso em outros mercados da pele de rã com esse objetivo foi realizado uma hidrólise enzimática com a corolase, por sonicador e shaker para ver qual seria o melhor preparo, para esse trabalho foram realizadas as análises de FRAP e DPPH, na primeira análise a amostra que apresentou o maior teor de redução foi a de 250W e pela segunda análise a amostra que teve um poder de redução melhor foi a de 500W, sendo o DPPH medido em IC 50 as amostras do preparo em shaker tiveram um resultado inferior assim mostrando que o uso do sonicador se mostra promissor para análises futuras. resíduos de pescado; FRAP; DPPH

**PALAVRAS-CHAVE:** resíduos de pescado; FRAP; DPPH

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



#### ABSTRACT

THE PROJECT AIMED TO USE AN INDUSTRY RESIDUE, WHICH IS KNOWN FOR USE IN OTHER MARKETS OF FROG SKIN FOR THIS PURPOSE WAS PERFORMED AN ENZYMATIC HYDROLYSIS WITH COROLASE, SONICATOR AND SHAKER TO SEE WHAT WOULD BE THE BEST PREPARATION FOR THIS WORK, FRAP AND DPPH ANALYZES WERE PERFORMED, IN THE FIRST ANALYSIS THE SAMPLE WITH THE HIGHEST REDUCTION CONTENT WAS 250W AND BY THE SECOND ANALYSIS THE SAMPLE THAT HAD A BETTER REDUCTION POWER WAS 500W, BEING THE DPPH MEASURED IN IC 50 SHAKER PREPARATION SAMPLES HAD A LOWER RESULT THUS SHOWING THAT THE USE OF THE SONICATOR IS PROMISING FOR FUTURE ANALYSIS.

**KEYWORDS:** FISH RESIDUES; FRAP; DPPH

## INTRODUÇÃO

Tendo como base a cultura nacional e a diversidade de recursos naturais com grande potencial farmacológico, vem crescendo cada vez mais o interesse das indústrias em pesquisas sobre substâncias ativas extraídas de fontes naturais. Isso motiva o desenvolvimento de uma infinidade de produtos com fins farmacológicos, cosméticos e nutricionais, o que garante a existência de terapias alternativas para determinadas patologias além de movimentar a economia e aumentar o lucro para o setor fabril (A CUNHA; DELARIVA 2009; QUERINO; PEREIRA 2006).

A presença de compostos antioxidantes para impedir a formação de radicais livres tanto no meio fisiológico quanto em produtos alimentícios é de extrema necessidade para evitar ou retardar a degradação de estruturas importantes de matrizes biológicas e alimentícias (RAMALHO; JORGE, 2006).

Em condições normais, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os radicais livres são efetivamente eliminados pelos sistemas de defesa antioxidante, como enzimas antioxidantes e fatores não enzimáticos. Contudo, sob condições patológicas, o equilíbrio entre a geração e eliminação de ROS é quebrada, como resultado destes eventos, biomacromoléculas incluindo DNA, lipídios de membrana e proteínas são danificadas por estresse oxidativo. Acredita-se que os radicais livres gerados a partir dos lipídios, proteínas e DNA da membrana de ataque estejam envolvidos em muitos distúrbios de saúde, como diabetes mellitus, câncer, doenças neurodegenerativas e inflamatórias (PRYOR, 1982; BUTTERFIELD, 2002).

Embora os antioxidantes sintéticos sejam eficazes e baratos em comparação com os naturais, suas aplicações são restritas devido a riscos potenciais relacionados à saúde. Portanto, um novo interesse tem sido desenvolvido para buscar agentes antioxidantes naturais e seguros (QIAN, Z., JUNG, W. & KIM, 2007).

O óleo de rã teve sua atividade e uso relatado e vem mostrando-se como uma boa alternativa no tratamento de asma, feridas e inflamações cutâneas e regeneração tecidual. Este óleo é extraído do tecido adiposo da rã e apresenta-se como uma fonte renovável de baixa toxicidade e biodegradável, podendo ser empregado em diversos tipos de formulações cosméticas e farmacêuticas (MACHADO, L.A, 2016). A família Ranidae, a qual as rãs pertencem, fazem parte do extenso grupo de anfíbios que provaram ser uma fonte particularmente rica de peptídeos. Os peptídeos da pele dos anfíbios têm sido objeto de intenso interesse de pesquisa em grupos acadêmicos e farmacêuticos devido às suas potenciais aplicações na pesquisa biofísica e taxonomia bioquímica para desenvolver novos produtos farmacêuticos (CLARKE, B.T., 1997).

Este trabalho tem o objetivo de avaliar o hidrolisado da pele de rã touro para a suplementação de alimentação humana e animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de rã, foram cedidas pela pós – doutoranda Ortência Nunes, para a realização desse trabalho as amostras de pele de rã in natura foram trituradas em moinho de facas e armazenadas no congelador. As amostras que

passaram pela hidrólise no shaker foram preparadas com 60 g de pele de rã in natura com 300 mL de água destilada, adicionada a enzima corolase 0,6 g ou seja 1% da massa da amostra e deixada em agitação e temperatura de 50 °C constante por 5 minutos, filtrada em peneira comercial, centrifugada por 10 minutos e filtrada em algodão. As amostras que passaram pelo aparelho sonicador ultrassônico e tiveram a mesma metodologia de preparo, mas houve a variação de potência (100, 250 e 500 W) aplicada para a realização da hidrólise no equipamento.

No preparo dessas amostras para liofilizar, foram separadas em frascos menores, colocadas em pequenas quantidades, embaladas com parafilme e colocadas no ultracongelador para chegar a -80 °C e colocadas por uma semana no liofilizador, para passar de líquidas para sólidos. Após esse processo, armazenadas novamente no congelador.

Para a análise de FRAP, foram utilizadas a balança analítica, centrífuga, tubos falcons e o espectrofotômetro. A análise iniciou com a preparação dos reagentes HCl 1,0 mol/L, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, solução tampão de acetato de sódio e TPTZ. Com os reagentes prontos, iniciou-se a análise com a leitura do FRAP em 593 nm de absorbância que representou o branco, tudo com a proteção da luz e em triplicata.

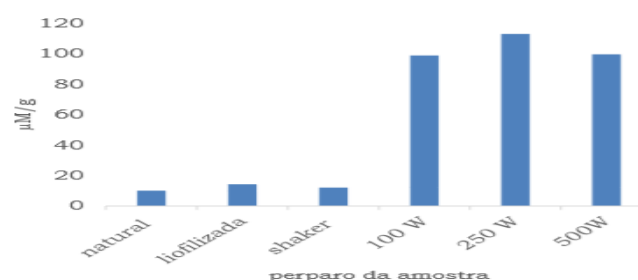
Foram adicionadas 3,0 mL de reagente FRAP, 100 microlitros de amostra e 300 microlitros de água destilada, incubado por 40 min a 37 °C, centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm e feita a leitura da absorbância em 593 nm (BOROSKI, M, 2015).

Para a análise de DPPH, foi utilizada a solução de DPPH (2,2-difenil1picrilhidrazila) em etanol 95%. Em eppendorf, foram adicionados 1 mL da amostra e 1 mL de DPPH, agitado no vortex por 10 segundos e incubado em uma mesa agitadora em proteção da luz por 1 hora, centrifugado e realizada a leitura da absorbância em 517 nm (BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSSET, C, 1997).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho foram realizadas análises com a amostra in natura, in natura passada pelo processo de liofilização, hidrolisadas com corolase por 5 minutos no shaker e no sonicador ultrassônico com as potências de 100, 250 e 500 W por também 5 minutos. Os resultados de FRAP estão apresentados na Figura 1 e os testes de probabilidade apresentados na Tabela 1.

Figura 1: atividade antioxidante pelo método de FRAP.



Fonte: Dos autores

A Tabela 1, apresenta os resultados de FRAP com os respectivos desvio-padrão e coeficiente de variação.

Tabela 1: Análises de probabilidade para os resultados de FRAP.

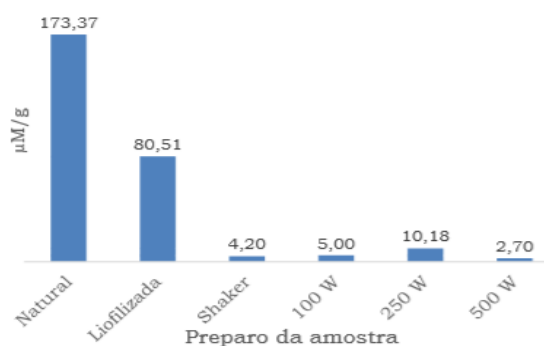
Amostra	Média	Desvio padrão (dp)	Coeficiente de variação (CV%)
In natura	0,265	0,011	4,286
Liofilizada	0,467	0,026	5,665
Shaker	0,392	0,006	1,552
100 W	0,360	0,041	11,369
250 W	0,298	0,010	3,305
500 W	0,307	0,019	6,103

Fonte: dos autores

O preparo que apresentou um melhor poder de redução do Fe<sup>3+</sup> foi a de 250W por 5 minutos preparada no sonicador (113,15 micromol ET por grama). As próximas a apresentarem melhores resultados foram as de 100 e 500W, mas entre as duas não houve variação significativa, ficando entre 99,70 e 99,01 micromol ET por grama, respectivamente. Como esperado, a que apresentou menor poder de redução foi a amostra in natura preparada em 1:10 em água destilada, apresentando 10,15 micromol ET por grama. A amostra in natura que passou pelo processo de liofilização teve um resultado superior ao esperado, se mostrando mais ativa do que a hidrólise no shaker, demonstrando assim que o processo é valido para uma melhoria nas análises.

Já na análise de DPPH, apresentada na Figura 2, a amostra que apresentou o IC50 em menor concentração foi a amostra que passou pelo processo de hidrólise por ultrassom a 500W.

Figura 2: análise antioxidante pela metodologia de DPPH



Fonte: dos autores

Com o aumento de processamento, pode-se perceber que a concentração para alcançar o índice desejado diminui. O processamento em shaker pode ser

comparado com o de 100W em ultrassom e a amostra in natura foi a que apresentou a menor atividade antioxidante.

Com base nesses dados, pode-se observar que as amostras apresentaram resultados bem diferentes entre si. Ao contrário do que é apresentado em literatura de pescado, tomando como base a tilápia (BONDET, V.; BRANDWILLIAMS, W.; BERSET, C, 1997), a correlação entre DPPH e FRAP foram parecidas entre si.

Uma explicação para esse assunto é que o radical DPPH é mais adequado a sistemas hidrofóbicos, pois são melhor solubilizados em solventes com baixa polaridade. Já os ensaios de FRAP são baseados em mecanismos de transferência de elétrons, sendo ele um ensaio hidrofílico e não corresponde bem a antioxidantes lipofílicos.

Outra análise importante para essa comparação é o ABTS que será realizado no decorrer da continuidade desse projeto, pois por ela ser uma análise que se aproxima melhor para a comparação que as duas apresentadas, poderá assim certificar melhor os resultados apresentados.

## CONCLUSÃO

Neste presente trabalho, apresentamos dados sobre os hidrolisados de pele de rã, sendo um trabalho novo em literatura mas com isso temos algumas dificuldades em achar referencias, mas nos mostrando um campo para a pesquisa tendo a continuidade, as análises de DPPH e FRAP mostraram que o sonificador apesar de acarretar um custo maior ao processo final, tem uma necessidade de menor quantidade para ter um resultado aproveitável.

## AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos deste projeto vão para a Fundação Araucária por financiar o projeto, a UTFPR por ceder os laboratórios do campus Toledo para a realização das análises e a Ortência Nunes por ceder as amostras utilizadas.

## REFERÊNCIAS

A CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW 1802): Uma revisão. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.* v. 4, n. 2, p. 34-36, jul./dez. 2009.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LebensmittelWissenschaft und-Technologie*, 30 (1997) 609-615.

BOROSKI, M. et al. Antioxidantes, princípios e métodos analíticos. *Appris*, 2015.

BUTTERFIELD, D.A., et al., 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's diseases. *J. Nutr. Biochem.* 13, 444–461.

CARVONERA, F. et al. Antioxidant capacity in tilapia fillets enriched with extract of acerola fruit residue. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* Vol 25 no 7 São Paulo, July 2014

CLARKE, B.T., 1997. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biol. Rev.* 72, 365–379.

MACHADO, L.A. et al. New Trends on Antineoplastic Therapy Research: Bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) Oil Nanostructured Systems. *Molecules.* Rio Grande do Norte, p. 2- 16. abr. 2016

PRYOR, W.A., ANN, N.Y., 1982. Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. *Acad. Sci.* 393, 1–22

QIAN, Z., JUNG, W. & KIM, S. (2007). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Elsevier* 99, 1690-1698. ([sci-hub.tw/10.1016/j.biortech.2007.04.005](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.005))

QUERINO, L.A.L.; PEREIRA, J.P.G. Geração de resíduos sólidos: a percepção da população de São Sebastião de Lagoa de Roça, Paraíba. *Ver Monograf Ambient – REMOA*, Santa Maria, v. 15, n. 1, p.404-415, jan./abr. 2006. Universidade Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/22361308>.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, p. 475-760, 2006.