

Fracionamento de glicosaminoglicanos extraídos de escamas de tilápia

Fractionation of glycosaminoglycans extracted from tilapia scales

RESUMO

Gustavo André Longhi dos Santos
guto_andre@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil.

Helois Cristina de Moura
Heloisademoura18@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Claudio Roberto Novello
crnovello@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Evellin Balbinot Alfaro
evebalbinot@gmail.com
Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

Alexandre Trindade Alfaro
alexandre@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



A tilápia está entre as espécies mais cultivadas no Brasil e no mundo. No processamento, são gerados diversos subprodutos com potencial para exploração. O trabalho teve como objetivo obter glicosaminoglicanos a partir de escamas de tilápia. O extrato bruto obtido das escamas de tilápia foi submetido à cromatografia de troca iônica para fracionamento dos glicosaminoglicanos (GAG's). Foram obtidas 95 alíquotas (5 mL), as quais foram agrupadas em seis frações, de acordo com a presença de ácido urônico e GAG's sulfatados. Foi observada a presença de ácido urônico nas frações II, III e V e a presença de GAG's sulfatados nas frações III e V. As escamas de tilápia podem ser uma potencial fonte para extração de GAG's.

PALAVRAS-CHAVE: Glicosaminoglicanos. Escamas. Tilápia.

ABSTRACT

Tilapia is among the most cultivated species in Brazil and in the world. In processing, several by-products are generated with potential for exploration. The work aimed to obtain glycosaminoglycans from tilapia scales. The crude extract obtained from tilapia scales was subjected to ion-exchange chromatography for fractionation of glycosaminoglycans (GAG's). 95 aliquots (5 mL) were obtained, which were grouped into six fractions, according to the presence of uronic acid and sulfated GAG's. The presence of uronic acid in fractions II, III, and V was observed, the presence of sulfated GAG's in fractions III and V. Tilapia scales can be a potential source for extraction of GAG's.

KEYWORDS: Glycosaminoglycans. Scales. Tilapia.



INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório da Associação Brasileira da Piscicultura Peixe br (2020), a produção brasileira de pescado cultivado atingiu 758.006 toneladas no ano de 2019. Conforme Sucasas (2011) o desempenho é representado pelo crescimento de 4,9 % em relação ao ano anterior. Assim Fao (2020) comenta que a crescente importância da atividade justifica-se por ser uma alternativa à pesca extrativa que chegou ao seu limite máximo sustentável, pois as espécies de interesse não têm volume suficiente para intensificar a captura. Portanto, com a atividade pesqueira estabilizada, um dos caminhos alternativos para o equilíbrio entre a demanda e a oferta do pescado no cenário mundial tem sido a aquicultura.

Conforme Brasil (2011) tendo uma costa marítima de 8.500 km de extensão e 12 % da reserva de água doce do planeta, clima propício e um crescente desenvolvimento do mercado interno, o Brasil desponta como um grande produtor de pescado cultivado como Peixe br (2019). Nos últimos seis anos, a produção de peixes cultivados apresentou crescimento de 31 %, de 578.000 toneladas em 2014 para 758.006 toneladas em 2019 em concordância com Peixe br (2020).

Com o crescente aumento do cultivo de tilápia e a consequente industrialização, cresce a geração de subprodutos durante o processo, dentre eles as escamas. Entretanto, há uma gama de possibilidades a serem exploradas, como a utilização desses materiais como matéria prima para a extração de compostos de interesse farmacológico, como os glicosaminoglicanos.

Os glicosaminoglicanos (GAGs) pertencem a uma família de polissacarídeos aniônicos, formados por cadeias não ramificada, compostas por unidades dissacarídicas repetitivas de hexosamina (glucosamina ou galactosamina), ácido urônico (ácido glucurônico ou idurônico), ou galactose em conformidade a Rudd et al. (2009) e Nakano et al. (2010). Os GAGs mais comuns são sulfato de condroitina (SC), sulfato de dermatana (SD), ácido hialurônico (AH), sulfato de queratana (SQ), heparina (Hp) e sulfato de heparana (HS) Pomin (2015).

Os GAGs possuem diferentes densidades de carga negativa em sua estrutura, resultando em propriedades estruturais e biológicas distintas (SILA et al., 2018). Podem funcionar como agentes terapêuticos em processos biológicos, apresentando efeitos como antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórios, antiproliferativos e anticoagulantes (KRICHEN et al., 2018; LIU et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2019; e SILA et al., 2018).

O aproveitamento das escamas é visto como uma possibilidade de agregação de valor ao subproduto, obtendo glicosaminoglicanos com propriedades terapêuticas e grandes possibilidades de aplicação. O trabalho teve como objetivo o fracionamento por cromatografia de troca iônica, dos glicosaminoglicanos extraídos de escamas de tilápia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado extrato bruto de glicosaminoglicanos (GAG's) obtido de escamas de tilápia além dos seguintes reagentes e insumos: resina (DEAE) *Sepharose Fast Flow*, acetato de sódio, Cloreto de sódio (NaCl), tetraborato de sódio, reagente de carbazol, reagente 1-9 dimetimetileno (DMB). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A.).

O extrato bruto contendo GAGs foi fracionado utilizando cromatografia de troca iônica em coluna clássica (3,5 cm x 20 cm) empacotada com resina (DEAE) *Sepharose Fast Flow* estabilizada previamente com tampão acetato (50 mM) em pH 5,0. Uma alíquota do extrato bruto (15 mg) foi solubilizada em 10 mL de água destilada e aplicada na coluna. A coluna foi eluída em *Stepwise* com solução tampão acetato (50 mM em pH 5,0), acrescida de diferentes concentrações de (NaCl) como fases móveis (0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 2.0 e 4.0 Mol). As alíquotas foram coletadas automaticamente em tubos de ensaio (aproximadamente 5 mL).

As alíquotas coletadas foram analisadas quanto ao conteúdo de ácido urônico conforme Dische (1946). Foram utilizados 100 µL da amostra na qual se adicionou 1 mL da solução de tetraborato de sódio 0,025 M (em ácido sulfúrico), então a mistura foi aquecida a 100°C por 10 min. Em seguida, ela foi arrefecida e adicionou-se 40 µL da solução de carbazol 0,125 % (em etanol). A amostra foi submetida a novo aquecimento de 100°C por 15 min com subsequente resfriamento. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro *UV-VIS Thermospectronic* a um comprimento de onda de 530 nm.

As frações amostrais foram avaliadas quanto à presença de grupamentos sulfatado, com o reagente (DMB). Da diluição foram utilizados 40 µL da amostra, na qual foi adicionado 1 mL da solução de (DMB), seguido de leitura em espectrofotômetro *UV-VIS Thermospectronic* a um comprimento de onda de 535 nm (Farndale, 1982; Sayer, 1982; Barrett, 1982).

O extrato bruto de GAGs foi eluído em coluna de troca iônica (*DEAE-Sepharose Fast Flow*), tendo como fase móvel uma solução com gradiente linear de (NaCl), que variou de 0,25 M até 4,0 M.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

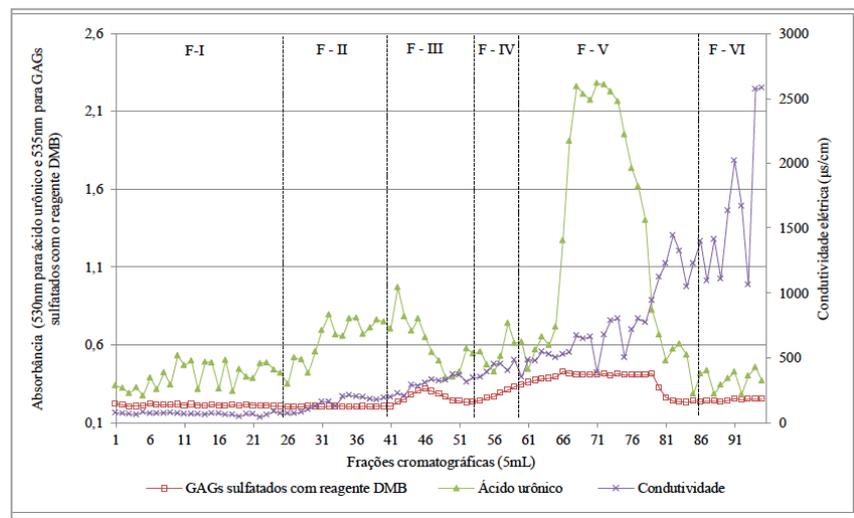
Foram obtidas 95 alíquotas (5 mL) que foram avaliadas quanto a presença de ácido urônico e GAG's sulfatados (figura 1).

De acordo com a densidade de carga negativa da amostra, ocorreu a sua interação com a resina, e conseqüentemente a sua eluição. Foram utilizadas soluções com diferentes concentrações de (NaCl), o que promoveu a separação dos compostos, formando os picos que são observados na figura 1. Analisando os perfis gráficos dos resultados obtidos na determinação de ácido urônico e (DMB), as alíquotas foram agrupadas em 6 frações.

A fração I foi considerada a partir da amostra 1 até a amostra 25 (obtidas na cromatografia de troca iônica) e com base na condutividade elétrica atribuiu-se a esse intervalo uma concentração salina de 0,25 75 mol/L. No intervalo das

amostras 26 a 40, observou-se a fração II a uma concentração de 0,50 75 mol/L de (NaCl). Já a fração III compreende as amostras que vão de 41 a 53, que eluíram a uma concentração salina de 0,75 75 mol/L. A fração IV, com uma concentração de 1,0 75 mol/L, abriga o intervalo de amostras que vai de 54 a 59. Eluindo a 2,0 75 mol/L de (NaCl) está a fração V, é representada pelas amostras 60 a 85. E por fim a fração VI, que agrupa as amostras 86 a 95, com uma concentração de 4,0 75 mol/L de (NaCl).

Figura 1- Determinação de ácido urônico e GAG's sulfatados nas aliquotas obtidas do extrato bruto extraído de escamas de tilápia.



Fonte: Autoria própria (2020).

A medida que a condutividade elétrica foi aumentando, as frações foram eluindo e conseqüentemente ocorrendo à separação dos compostos presentes na amostra, conforme é observado na (figura 1). A possibilidade de separação está justamente relacionada à capacidade de interação das moléculas do analito com a fase estacionária, quanto maior for à interação mais lenta será a eluição conforme Collins (2006); Braga (2006) e Bonato (2006). Os GAG's por possuírem cargas negativas, interagem com a resina, neste caso, composta por esferas de agarose e dietilaminoetil (DEAE), carregada positivamente.

O método de carbazol é muito eficiente para detectar ácido urônico Bitter (1962) e Muir (1962). No presente estudo, constatou-se a presença de ácido urônico após o fracionamento por cromatografia de troca aniônica, observou-se um pico majoritário nas frações II e III, e um pico na fração V. A fração II corresponde a uma concentração de (NaCl) de 0,5 mol/L, a fração III 0,75 mol/L, já a fração V, a uma concentração de 2,0 mol/L.

O método possibilita a identificação do ácido urônico com diferentes conformações espaciais, tanto na forma de ácido β -D-glucurônico e α -L-idurônico. Sendo assim, os picos detectados para a amostra de escama correspondem as diferentes conformações do ácido urônico que compõe os GAG's. Sabe-se que o único GAG que não apresenta ácido urônico em nenhuma de suas conformações é o sulfato de queratano de acordo com Sampaio (2006) e

Nader (2006), portanto a análise não pode ser considerada seletiva, uma vez que os resultados de absorbância indicam somente a presença de GAG's mas não consegue diferenciá-los por tipo.

O corante DMB é um corante catiônico e possui propriedades metacromáticas, ou seja, tem uma aparência azulada na ausência de GAG's sulfatados e torna-se lilás na presença dessas substâncias em conformidade com (TEMPLETON, 1988).

Os resultados de DMB obtidos do material extraído de escamas de tilápia apontam a presença de GAG's sulfatados. Dados estes que nos mostram dois picos majoritários. Os picos correspondem às frações III e V, eluídas a uma concentração de 0,75 e 2,0 mol/L, respectivamente.

Na análise de carbazol, a qual identifica a presença de ácido urônico, são observados 2 picos majoritários como citados anteriormente, assim como na análise de DMB. Esses picos coincidem nos tempos de eluição e nas concentrações de NaCl. Sendo assim, pode-se dizer que os resultados da análise de (DMB), corroboram com os resultados da análise de carbazol, confirmando a presença de GAG'S. Devido à reação metacromática o método de DMB, detectou a presença de GAG's sulfatados.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, escamas de tilápia um subproduto da indústria pesqueira de baixo valor agregado, possuem potencial para a extração de glicosaminoglicanos. Conforme os resultados apresentados, o perfil gráfico obtido na determinação de ácido urônico e (DMB), denota a presença de GAG's sulfatados, nas frações II e III e V. Novos estudos serão realizados afim de identificar quais GAG's estão presentes e avaliar seu potencial farmacológico.

REFERÊNCIAS

BITTER, T; MUIR, H.M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 330-334, 1962.

BORDIGNON, A. C. **Caracterização da pele e da gelatina extraída de peles congeladas e salgadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 114 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**. Brasília, 60p., 2011.

CHAGURI, M. P. **Utilização de escamas e *Eichhorniacrassipes* no tratamento de efluentes de curtume de peles de tilápia.** 2010. 65f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da unicamp, 2006. 452p.

DISCHE, Z. **A new specific color reaction of hexuronic acids.** Journal of Biological Chemistry, Maryland, v.167, n.1, p.189-198, 1946.

FAO, 2012. **Fisheries and Aquaculture Department food and agriculture organization of the united nations.** Fisheries Department. Roma, p. 230, 2012.

FAO, 2020. **FAO Aquaculture Newsletter.** Roma, n. 61, p.60, 2020.

FARNDAL, R. W.; BUTTLE, D.; BARRETT, A. J. Farndale. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 833, n. 2, p. 173–177, 1986.

KRICHEN, F.; GHLISSI, Z.; ABDALLAH, R. Ben; KALLEL, R.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; CARMEN GÓMEZ-GUILLÉN, M.; SILA, A.; BOUDAWARA, T.; BOUGATEF, A. **Glycosaminoglycans from grey triggerfish and smooth hound skins: Rheological, Anti-inflammatory and wound healing properties.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 118, p. 965–975, 2018.

LIU, J.; ZHOU, L.; HE, Z.; GAO, N.; SHANG, F.; XU, J.; LI, Z. **Structural analysis and biological activity of a highly regular glycosaminoglycan from *Achatina fulica*.** Carbohydrate Polymers, v. 181, p. 433–441, 2018a.

LÓPEZ-MOSQUERA, M. E et al. **Composting fish waste and seaweed to produce a fertilizer for use in organic agriculture.** Procedia Environmental Science, v. 9, p. 113–117, 2011.

NAKANO, T., BETTI, M., PIETRASIK, Z. Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate glycosaminoglycans. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 2, p. 61-74, 2010.

NOGUEIRA, A. V; ROSSI, G. R.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; TRINDADE, E. S.; CIPRIANI, T. R. **International Journal of Biological Macromolecules** Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoglycans of pharmacological

interest. International Journal of Biological Macromolecules, v. 121, p. 239–248, 2019.

PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário da Piscicultura 2019**, 2019. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019/>. Acesso em: 01 mai. 2020.

PEIXE BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário da Piscicultura 2020**, 2020. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020//>. Acesso em: 01 mai. 2020.

POMIN, V. H. **A Dilemma in the Glycosaminoglycan-Based Therapy : Synthetic or Naturally Unique Molecules ?** Medicinal Research Reviews, v. 35, n. 6, p. 1195–1219, 2015a.

RUDD, T, R. et al. **Glycosaminoglycan origin and structure revealed by multivariate analysis of NMR and CD spectra.** Glycobiology, v. 19, p. 52-67, 2009.

SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. **Emergence and structural characteristics of chondroitin sulfates in the animal kingdom.** Advances in Pharmacology, v. 53, n. 05, p. 233–251 , 2006.

SILA, A.; BOUGATEF, H.; CAPITANI, F.; KRICHEN, F.; MANTOVANI, V.; BEN, I.; GALEOTTI, F.; MACCARI, F.; BOUGATEF, A. **Studies on European eel skin sulfated glycosaminoglycans : Recovery , structural characterization and anticoagulant activity.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 115, p. 891–899, 2018.

STONE, J.E. **Urine analysis in the diagnosis of mucopolysaccharide disorders,** Annals of Clinical Biochemistry, v.35, p. 207–225, 1998.

SUCASAS, L. F. A. **Avaliação do resíduo do processamento de pescado e desenvolvimento de co-produtos visando o incremento da sustentabilidade da cadeia produtiva.** 2011. 166f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo.

TEMPLETON, D.M. **The basis and applicability of the dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans.** Connective Tissue Research, v.17, n.1, p.23-32, 1988.