

Avaliação do potencial bioativo de glicosaminoglicanos de barbelas de peru

Evaluation of the bioactive potential of glycosaminoglycans in turkey dewlap

RESUMO

Gustavo Santana de Almeida
gustavo.almeida2511@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil

Alexandre da Trindade Alfaro
alexandre@utfpr.edu.br
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

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

O estudo teve como objetivo extrair glicosaminoglicanos (GAGs) totais de barbelas de peru e avaliar o seu potencial bioativo. As barbelas foram cedidas por uma empresa situada no oeste do estado do Paraná, armazenadas até o momento de sua análise e caracterizadas quanto a sua composição proximal. Foi realizada a extração de GAGs totais com a enzima papaína e feita a determinação do seu potencial na inibição da enzima tirosinase. As barbelas de peru apresentaram 79,22 % de umidade, 17,84 % de proteína, 2,18 % de lipídeos, cinzas 0,30 % e 0,46 % de carboidratos. O processo de extração dos GAGs, apresentou um alto rendimento quando comparado a outras fontes. Os GAGs totais extraídos da barbela de peru, apresentaram potencial de inibição da atividade de tirosinase, principalmente em concentrações mais elevadas (70 e 90 µg/mL).

PALAVRAS-CHAVE: Indústria avícola - Subprodutos. Alimentos – Composição. Inibição.

ABSTRACT

The study aimed to extract total glycosaminoglycans (GAGs) from turkey dewlap and evaluate their bioactive potential. The dewlap were provided by a company located in the west of the state of Paraná, stored until the moment of their analysis and characterized concerning to their proximal composition. Total GAGs were extracted with the enzyme papain and their potential for inhibiting the tyrosinase enzyme was determined. The turkey dewlap shows 79.22% moisture, 17.84% protein, 2.18% lipids, 0.30% ash and 0.46% carbohydrates. The process of extracting the GAGs, showed a high yield when compared to other sources. The total GAGs extracted from the turkey dewlap, present potential of inhibition of tyrosinase activity, mainly at higher concentrations (70 and 90 µg/mL).

KEYWORDS: Poultry industry – By-products. Foods – Composition. Inhibition

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.



INTRODUÇÃO

Mundialmente o Brasil é o terceiro maior produtor de peru (*Meleagris gallopavo*), produzindo anualmente, 181 mil toneladas de peru. A região sul do Brasil é responsável por 90% desta industrialização (ABPA, 2018).

A indústria de processamento de peru durante a produção gera uma grande quantidade de resíduos e entre eles estão os subprodutos que são partes não comestíveis, que não podem ser embaladas e comercializadas, tais como: barbela, papo, traqueia, esôfago, baço e pulmões. O destino destes subprodutos é para fins pouco nobres (farinha para ração animal, sabão, óleo entre outros), de baixo retorno econômico (LIMA, 2020).

Estudos explorando subprodutos da industrialização de peru (*Meleagris gallopavo*) para fins mais nobres, ainda são escassos. Sendo o Brasil um dos principais produtores mundiais de peru e gerador de elevadas sobras de seu processamento (ABPA, 2018).

As barbelas estão localizadas abaixo do pescoço do peru macho, possui coloração avermelhada é uma tuberosidade carnosa composta de tecido conjuntivo. Os glicosaminoglicanos (GAGs) estão presentes na matriz extracelular, composta de proteoglicanos, glicosaminoglicanos e elementos celulares (NELSON; COX, 2014). Presentes em todas as células animais com diferenças estruturais dependendo do tecido ou do organismo de origem (ALBERTS et al., 2010).

Os GAGs são cadeias polissacarídicas não-ramificadas, composta de unidades repetidas de dissacarídeos. São chamados GAGs porque um dos dois açúcares do dissacarídeo repetido sempre é um açúcar aminado (N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina) e normalmente sulfatado. O segundo açúcar, normalmente é um ácido urônico (glicurônico ou idurônico) (BOAS, 1949).

GAGs são carregados negativamente e estão divididos em seis grupos principais de acordo com a molécula de açúcar e o tipo de ligação são eles: sulfato de condroitina, sulfato de queratana, sulfato de dermatana, sulfato de heparina, sulfato de heparana e ácido hialurônico que é o único não sulfatado (BOAS, 1949)(RANI; BARUAH; GOYAL, 2017).

A tirosinase é uma enzima que está envolvida no estágio inicial de uma série de reações e é vital no caminho biossintético da melanina no corpo humano (LIMTRAKUL et al., 2016). Quando envolvida na quimioterapia, auxilia no controle da produção de melanina, impedindo a hiperpigmentação, como sardas, por exemplo, que é causada pelo melanócito ativado na epiderme (LEE et al., 2017).

O aumento da irradiação ultravioleta pode induzir anormalidades no tecido da pele, envelhecimento e até mesmo câncer (KIM et al., 2018). Dessa forma, a inibição da atividade da tirosinase tende a induzir o clareamento do órgão (PAPAKONSTANTINOU; ROTH; KARAKIULAKIS, 2012).

Atualmente, a indústria farmacológica vem explorando as atividades biológicas dos GAGs, que são conhecidos por suas ações anticoagulantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e antiproliferativas (GRAÇA et al., 2020)(POMIN, 2015).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo extrair glicosaminoglicanos totais das barbelas de peru e avaliar o seu potencial bioativo para inibição de tirosinase.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas barbelas de perus machos (*Meleagris gallopavo*). O material foi cedido por uma empresa de abate de perus, localizada no oeste do Paraná e coletado em julho de 2018 e mantidas congeladas (-18 °C) até o momento de uso. A extração dos glicosaminoglicanos foi realizada com a enzima papaína e os reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

Para o preparo da matéria-prima as amostras foram descongeladas sob refrigeração 4 °C por 6 h, após foram cortadas na dimensão de 4 x 4 cm e utilizadas para posteriores análises.

Foram feitas as determinações da composição proximal das barbelas de peru. A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, a proteína pelo método de Kjeldahl, para o teor lipídico foi utilizado o método de Soxhlet e o resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado submetendo as amostras a 550 °C conforme procedimento da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012). Os carboidratos foram determinados pela diferença dos valores encontrados para umidade, lipídeos, proteínas, cinzas (AOAC, 2012).

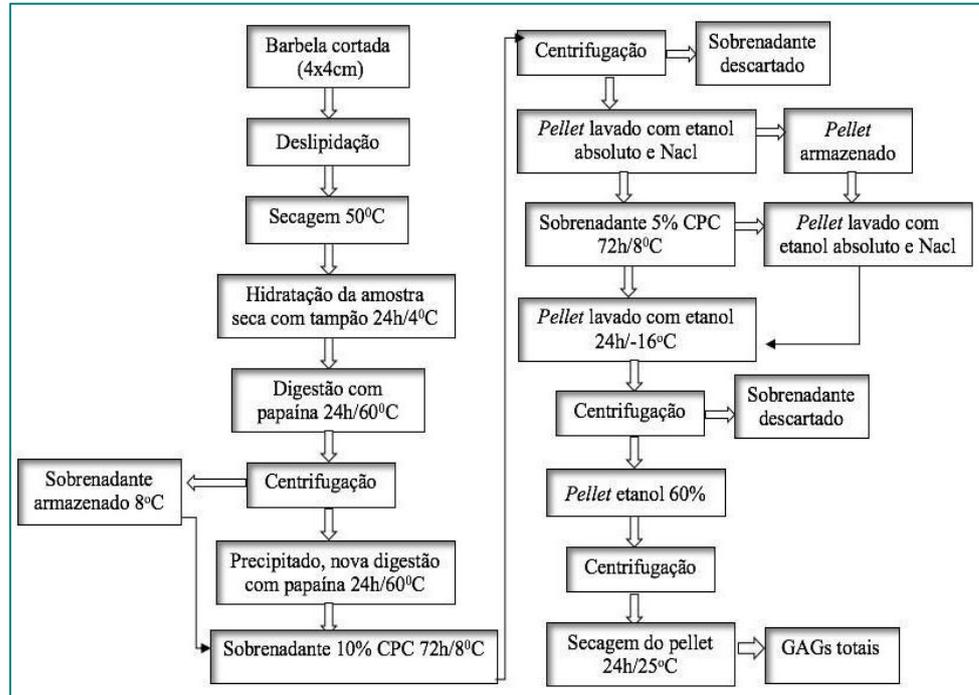
A extração dos GAGs foi realizada seguindo a metodologia de Cardoso e colaboradores (1992) com modificações. O processo está ilustrado na Figura 1. As barbelas foram cortadas e a retirada do material lipídico (deslipidação) ocorreu com imersão em 50 mL de acetona por 24 h à 4 °C. Após foram submetidas a 2 substituições de 24 horas cada em 40 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, v/v) por 24 horas a 25 °C. O solvente foi decantado e as amostras secas em estufa com circulação a 50 °C durante a noite. Os tecidos secos foram hidratados em tampão de digestão (acetato de sódio 100 mM pH = 5,0, cisteína 5,0 mM e EDTA dissódico 5,0 mM) na proporção de 2,0 mL de tampão para 100 mg de tecido seco.

Após hidratação por 24 h a 4 °C, os tecidos receberam solução de papaína (20 mg/L), preparada na solução tampão de digestão descrita anteriormente, numa proporção de 0,5 mL para 100 mg de tecido seco. Os tecidos foram incubados por 24 horas a 60 °C e centrifugados a 3200 rpm por 30 min e após o sobrenadante foi retirado.

O precipitado foi submetido à uma nova incubação com papaína, sob as mesmas condições descritas anteriormente e em seguida, foi adicionado ao sobrenadante cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10%, numa proporção de 0,2 mL para 100 mg de tecido seco e deixado em repouso por 72 horas à 8 °C. A amostra seguiu para centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com 3,0 mL de solução de NaCl 2,0 M e etanol absoluto (100:15, v/v). O sobrenadante resultante foi precipitado novamente utilizando-se cloreto de cetilpiridínio (CPC) 5%, numa proporção de 0,2 mL para 100 mg de tecido seco e deixado em repouso por 72 horas a 8 °C. Na amostra resultante foram adicionados dois volumes de etanol absoluto, depois foi deixada em repouso por 24 horas a -16 °C. A amostra seguiu para a centrifugação, posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado uma vez com 10 mL de etanol 80% e centrifugado novamente, após

o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante do processo, congelado à -18 °C e liofilizado, obtendo assim o teor de GAGs totais.

Figura 1 – Fluxograma do processo de extração de GAGs da barbeta de peru



Fonte: Cardoso e colaboradores (1992).

O rendimento da extração dos glicosaminoglicanos foram calculados de acordo com a Eq. 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{peso seco de GAG's totais (g)}}{\text{peso da barbeta (g)}} \quad (1)$$

A atividade inibitória contra a enzima tirosinase foi determinada pelo método de Hearing e Jimenez (1987) com modificações, utilizando a L-tirosina como substrato. Amostras de 50 µL nas concentrações de 10, 30, 50, 70 e 90 µL foram misturadas com 30 µL de tirosinase (330 U/ mL em tampão fosfato, pH 6,82) e incubadas por 5 min. Em seguida, 120 µL de substrato (L-tirosina, 4 mM em tampão) foram adicionados ao meio reacional. Na sequência foram incubadas por 10 min a 37 °C. Após, monitorou-se a cinética de reação fazendo-se o uso do espectrofotômetro (Bel-photonics –UV- M-51) medindo-se a absorvância no comprimento de onda de 475 nm, durante 10 minutos de 30 em 30 s.

A percentual de inibição foi calculada conforme Eq. (2)

$$\text{Inibição da tirosinase (\%)} = 100 - \frac{\text{Absorvância da amostra}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 100 \quad (2)$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

São escassos estudos investigando os subprodutos de peru e não foram encontrados estudos que relatem a extração de glicosaminoglicanos em barbela

de peru. A composição proximal das barbelas de peru está apresentada na tabela 1.

As barbelas de peru apresentaram (79,22 %) de umidade, (17,84 %) de proteína, (2,18 %) de lipídeos, cinzas (0,30 %) e (0,46 %) de carboidratos. Estes valores encontrados, são similares ao da crista de galo relatados por Swann, (1967).

Apesar das barbelas de peru por serem um subproduto da industrialização, subutilizado com baixo o teor de hidratos de carbono, há indícios da presença de GAGs. A extração destes GAGs conhecidos por suas propriedades farmacológicas, poder ser uma alternativa para a valoração destes subprodutos.

Tabela 1 – Composição proximal das barbelas de peru antes da escaldagem

Fração	Média g (%) (Base úmida)	Média g (%) (Base seca)
Umidade	79,22 ± 0,05	-
Proteína	17,84 ± 0,04	85,85
Cinzas	0,30 ± 0,01	1,44
Lipídeos	2,18 ± 0,09	10,49
Carboidratos	0,46 ± 0,03	2,22

Fonte: Autoria própria (2020).

EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS

A extração de glicosaminoglicanos é um processo de alto custo, laborioso e de baixo rendimento (RANI; BARUAH; GOYAL, 2017), com um tempo médio de extração de 9 dias. No entanto, neste trabalho foram de 13 dias, devido a etapa de precipitação ter sido mais longa. O tempo de precipitação com cloreto de cetilpiridínio (CPC) comumente é 24 h, no entanto, devido ao pouco material precipitado neste período, esta etapa foi prolongada para 72 h.

O CPC é um detergente catiônico hidrofílico que possui alta capacidade para se ligar se á GAGs (MACCARI; FERRARINI; VOLPI, 2010). O ácido hialurônico sendo uma molécula carregada negativamente pode ser mais facilmente precipitada com o CPC, por formar um sal e auxiliar na eliminação de vários contaminantes, que podem interferir no rendimento, na massa molar e consequentemente na qualidade do glicosaminoglicano produzido (PANAGOS et al., 2014).

Posterior ao processo de extração foi produzido os glicosaminoglicanos totais da barbela do peru (GTB). No presente estudo o rendimento obtido foi de 2,7% de material seco. Esse rendimento foi superior ao relatado por Liu et al. (2018), que obteve 1% em caramujo (*Achantina fulica*) e Silva et al. (2018) que alcançou 1,22% em enguia europeia (*Anguilla anguilla*).

O elevado rendimento obtido neste estudo, pode estar relacionado com a etapa de precipitação prolongada.

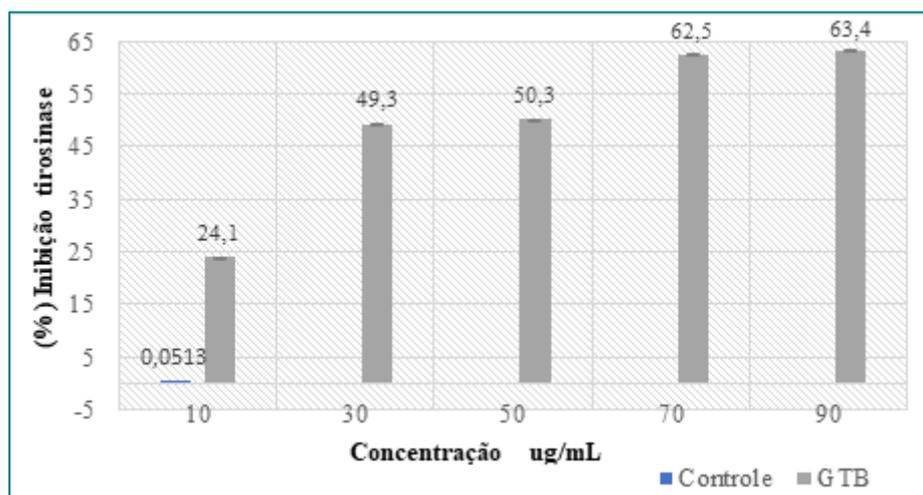
ATIVIDADE DE INIBITÓRIA DA TIROSINASE

O efeito da atividade de inibição da tirosinase foi realizado na amostra de GTB e os resultados estão apresentados na Figura 2. Os dados mostram que todas as concentrações (10 a 90 µg/mL) apresentaram inibição da atividade de tirosinase em comparação controle. Observa-se que com o aumento da concentração o percentual inibitório é elevado. As amostras de GTB apresentaram atividade de inibição mais elevada nas concentrações (70 e 90 µg/mL).

No estudo de Lee et al., (2017), os GAGs da casca de ovos (*Lipis tessellatus*) inibiu 11,8% de tirosinase na concentração de 50 µg/mL.

De acordo com os resultados apresentados, os glicosaminoglicanos totais extraídos da barbela do peru, demonstrou potencial para inibir a atividade da tirosinase.

Figura 2 - Percentual de inibição da tirosinase nas amostras de GTB, nas concentrações de 10, 30 50, 70 e 90 µg/mL



Fonte: Gustavo Santana (2020)

CONCLUSÕES

As barbelas de peru apresentaram umidade (79,22 %), proteína (17,84 %), lipídeos (2,18 %), cinzas (0,30%) e carboidratos (0,46 %). O processo apresentou um elevado rendimento (2,7%) para extração de GAGs.

Os glicosaminoglicanos totais extraídos da barbela do peru, demonstraram potencial para inibir a atividade da tirosinase. As barbelas de peru podem ser fonte para extração de glicosaminoglicanos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná/Brasil.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Annual Report of the Brazilian Association of Animal Protein**. Relatório anual. p. 176, 2018.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017

AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 19th. ed Gaithersburg, MD, USA, 2019.

BOAS, N. F. Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb. **Journal Biology Chemistry**, v. 181, p. 573–575, 1949.

CARDOSO, L.E. et al. Comparative analysis of glycosaminoglycans from human umbilical arteries in normal subjects and in pathological conditions affective pregnancy. **Laboratory Investigation**, v. 67, n. 5, p. 588–595, 1992.

GRAÇA, M. F. P. et al. Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 241, 2020.

HEARING, V. J; JIMENEZ, M. Mammalian tyrosinase - the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. **International Journal Of Biochemistry**, [S.L.], v. 19, n. 12, p. 1141-1147, jan. 1987. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/0020-711x\(87\)90095-4](http://dx.doi.org/10.1016/0020-711x(87)90095-4).

KIM, J. et al. Archives of Oral Biology Effects of molecular weight of hyaluronic acid on its viscosity and enzymatic activities of lysozyme and peroxidase. **Archives of Oral Biology**, v. 89, n. August 2017, p. 55–64, 2018.

LEE, J. J. et al. Skin regeneration effect of the Glycosaminoglycans from Liparis tessellatus eggs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1369–1374, 2017.

LIMA, R. A. de S. Crescimento da produção brasileira de peru. In: SNA, Sociedade Nacional de Agricultura. **Animal Business Brasil**. n. 16, 2014. Disponível em: https://issuu.com/sociedadenedacionaldeagricultura/docs/abb_16. Acesso em: 20 out. 2020

LIMTRAKUL, P. et al. Anti-aging and tyrosinase inhibition effects of Cassia fistula flower butanolic extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

LIU, J. et al. Structural analysis and biological activity of a highly regular glycosaminoglycan from Achatina fulica. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 433–441, 2018.

MACCARI, F.; FERRARINI, F.; VOLPI, N. Structural characterization of chondroitin sulfate from sturgeon bone. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 11, p. 1575–1580, 2010.

NELSON, DAVID L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed ed. Porto Alegre, v. 7, 2019.

PANAGOS, C. G. et al. Characterisation of hyaluronic acid and chondroitin/dermatan sulfate from the lumpsucker fish, *C. lumpus*. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 106, p. 25-33, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.090>.

PAPAKONSTANTINO, E.; ROTH, M.; KARAKIULAKIS, G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, 2012.

POMIN, Vitor H. A Dilemma in the Glycosaminoglycan-Based Therapy: synthetic or naturally unique molecules?. **Medicinal Research Reviews**, [s.l.], v. 35, n. 6, p. 1195-1219, 7 jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21356>.

RANI, A.; BARUAH, R.; GOYAL, A. Physicochemical , antioxidant and biocompatible properties of chondroitin sulphate isolated from chicken keel bone for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 11–19, 2017.

SILVA, F. F. G. Oocyte and egg quality indicators in European eel: lipid droplet coalescence and fatty acid composition. **Aquaculture**, [s.l.], v. 496, p. 30-38, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.008>.

SWANN, D. A. Studies on hyaluronic acid I. The preparation and properties of rooster comb. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1, n. 1968, p. 17–30, 1967.