

Extração de glicosaminoglicanos de escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*)

Glycosaminoglycan extraction from tilapia scales (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO

Raul Bruno Messi Segatel
segatel@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Francisco Beltrão,
Paraná, Brasil

Heoisa 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
Atalfaro11@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Francisco Beltrão,
Paraná, Brasil

A obtenção de glicosaminoglicanos é visto como uma possibilidade de aproveitamento das escamas e agregação de valor a subprodutos. O trabalho teve como objetivo a caracterização da matéria-prima, bem como, a obtenção e determinação do rendimento da extração dos glicosaminoglicanos (GAGs) totais obtidas das escamas de tilapia. Realizou-se a análise de composição proximal, na qual foi avaliado o conteúdo de umidade, proteína bruta, lipídeos e resíduo mineral fixo. A amostra foi submetida a proteólise por enzimas, trituração, hidrólise enzimática e centrifugação. Os resultados obtidos apresentaram teor de umidade em 52,46 %, proteína bruta 29,23 %, lipídios < 0,10 %, carboidratos < 0,80% e resíduo mineral fixo em torno de 18,90 %. O processo de extração dos GAGs teve um rendimento bruto de 0,86%, similar ao rendimento obtido para outras fontes de origem marinha.

PALAVRAS-CHAVE: Glicosaminoglicanos. Tilápia. Extração.

ABSTRACT

The obtaining of glycosaminoglycans is seen as a possibility of using the scales and adding value to by-products. The work aimed to characterize the raw material, as well as obtaining and determining the yield of the total glycosaminoglycans (GAGs) extraction obtained from the tilapia scales. The analysis of the proximal composition was carried out, in which the content of moisture, crude protein, lipids and fixed mineral residue was evaluated. The sample was submitted to proteolysis by enzymes, crushing, enzymatic hydrolysis and centrifugation. The results obtained showed moisture content in 52.46%, crude protein 29.23%, lipids <0.10%, carbohydrates <0.80% and fixed mineral residue around 18.90%. The GAGs extraction process had a gross yield of 0.86%, similar to the yield obtained for other sources of marine origin.

KEYWORDS: Glycosaminoglycans. Tilapia. Extraction.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta clima propício, grandes áreas disponíveis, reservatórios de água doce e uma extensa costa litorânea, portanto, a aquicultura e a pesca extrativista têm grande potencial de desenvolvimento (PEIXE BR, 2020). Atrelado a isso está o aumento do consumo de pescado, que tem apresentado uma tendência de crescimento constante, devido ao maior apelo mercadológico e de saudabilidade (FAO, 2020).

O aumento da demanda no setor tem impulsionado a criação de tilápia em cativeiro e a produção nas indústrias de processamento (PEIXE BR, 2019). Decorrente a esse aumento de produção, existe uma geração ainda maior de subprodutos oriundos do beneficiamento da matéria prima. Industrialmente, a filetagem de tilápia tem um rendimento final em torno de 32% do peso do peixe vivo, e o restante é considerado subproduto (FAO, 2020).

Para a tilápia, a cabeça, carcaça e vísceras constituem cerca de 54% do peso vivo, a pele 10%, escamas 1% e as aparas dorsais e ventrais e o corte em “v” do filé, cerca de até 5%. O volume de quaisquer subprodutos gerados, e rendimento no processamento estão diretamente relacionados com fatores como a espécie, tipo de corte, entre outros (VIDOTTI, 2011). Comparadas aos demais subprodutos do processamento industrial, as escamas representam uma menor parcela do montante total. Porém, frente a todo pescado abatido diariamente, o volume de escamas acaba se tornando de extrema significância (VIVIAN, 2013).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos lineares carregados negativamente, compostos por unidades dissacarídicas repetitivas de hexosamina (glucosamina ou galactosamina), ácido urônico (ácido glucurônico ou idurônico), ou galactose (RUDD et al., 2009). Os GAG's mais comuns são sulfato de condroitina (SC), sulfato de dermatana (SD), ácido hialurônico (AH), sulfato de queratana (SQ) heparina (HE) e sulfato de heparana (SH) (NAKANO et al., 2010).

Em virtude do montante de subprodutos gerados com o processamento do pescado há uma urgente necessidade de adoção de medidas sustentáveis pelas indústrias beneficiadoras. A obtenção de glicosaminoglicanos é visto como uma possibilidade de aproveitamento das escamas e agregação de valor ao subproduto. Considerando a grande importância da utilização de GAGs como fármacos, a busca de novas fontes para isolamento desses compostos a partir de um subproduto, possui grande relevância social, ambiental e econômica. O trabalho teve como objetivo a caracterização da matéria-prima, bem como, a obtenção e determinação do rendimento da extração dos glicosaminoglicanos (GAGs) totais.

MATERIAL E MÉTODOS

As escamas foram fornecidas por uma indústria de abate e processamento de tilápia, localizada no Sudoeste do estado do Paraná. No local, são abatidos em média 10.000 Kg/dia da espécie. Foram coletados 5kg do subproduto, que foi lavado em água corrente, congelado e transportado sob refrigeração ao Laboratório de Tecnologia de Pescados da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus de Francisco Beltrão (FB).

COMPOSIÇÃO PROXIMAL DA MATÉRIA PRIMA

Realizou-se a análise de composição proximal, na qual foi avaliado o conteúdo de umidade de acordo com o método ISO 1442, proteína bruta ISO 1871, lipídeos NMKL 181, resíduo mineral fixo conforme a ISO 936 e carboidratos (BRASIL, 2017).

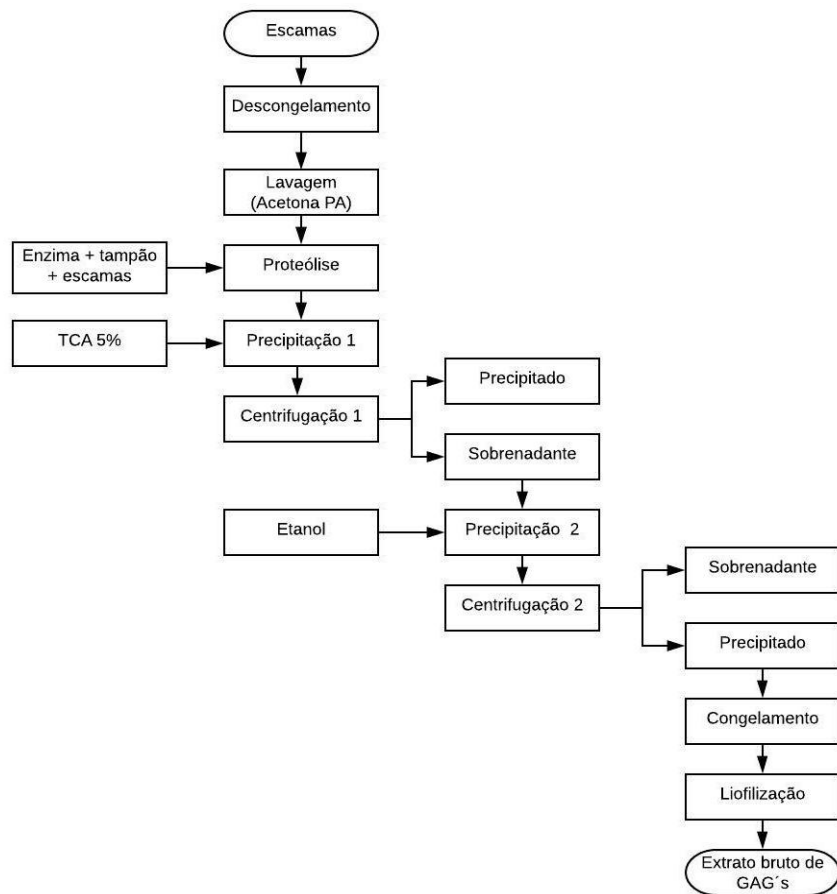
EXTRAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS

As escamas (5 Kg) foram descongeladas sob refrigeração e desengorduradas com 1,0 L de acetona (PA). Em seguida, parte da amostra (110 g) foi submetida à proteólise mediante a ação da enzima papaína (80 g) e 7 L de tampão fosfato – cisteína 0,05M em pH 6,5 (CARDOSO, et al., 1992), na temperatura de 60 °C. Foram utilizadas 80g de enzima, 110g de escamas e 7 L de tampão fosfato – cisteína 0,05M, pH 6,5. Após 48 h de digestão as escamas foram submetidas a uma etapa de trituração, em turbo processador industrial (Skysem, modelo LB-15MB) por 18 minutos (min). O processo de hidrólise teve sequência a 60°C, sob condições controladas de temperatura, com duração total de 14 dias (Figura 1).

Após a hidrólise enzimática, as proteínas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA 5% em água destilada), por 20 min em banho de gelo. Em seguida a amostra foi centrifugada a 3200rpm por 20 min e separado o sobrenadante. Ao sobrenadante, foram adicionados sob agitação 2,5 volumes de etanol e mantido em repouso por 24 horas a uma temperatura de -20°C. Na sequência, a amostra foi novamente centrifugada, o precipitado, separado e liofilizado para a obtenção do extrato bruto de GAGs.

Na figura abaixo podemos observar o processo de extração dos Glicosaminoglicanos, separadas por etapas do fluxograma.

Figura 1- Fluxograma do processo de extração dos GAG's de escamas de tilápia.



Fonte: MOURA, (2020).

RENDIMENTO BRUTO

O rendimento foi calculado considerando o extrato bruto, conforme a equação 1.

$$RB (\%) = \frac{PSE}{PSA} * 100 \quad (1)$$

Onde: RB: rendimento bruto (%); PSE: peso seco extrato bruto (g); PSA: peso seco da amostra (g).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

COMPOSIÇÃO PROXIMAL DAS ESCAMAS

Mediante avaliação da composição proximal das escamas foi possível observar que o teor de umidade está em 52,46 %, proteína bruta 29,23 %, lipídios < 0,10 %, carboidratos < 0,80% e resíduo mineral fixo em torno de 18,90 %. Vivian (2013) caracterizou escamas de tilápia nilótica e relatou ter encontrado em média 9,46% de umidade, 49,06% de proteína, 0,22% de extrato etéreo e 44,51% de matéria mineral.

No presente estudo, as escamas foram coletas logo após a saída das mesmas do equipamento de descamação, lavadas em água corrente, congeladas e então destinadas a realização dos procedimentos analíticos. Já no estudo de Vivian (2013), as escamas foram inicialmente secas e depois conduzidas para a realização das análises. Essa etapa inicial influenciará diretamente na composição das amostras, principalmente quanto ao teor de umidade.

Quanto ao percentual de carboidratos, a amostra apresentou 0,86 %. Apesar do baixo percentual de hidratos de carbono, sabe-se sobre a presença de alguns compostos sacarídeos de interesse que poderiam ser isolados e estudados. Uma vez, que o grande desafio das indústrias tem sido a busca por novas possibilidades de aproveitamento de seus subprodutos e conseqüentemente agregação de valor ao processo.

EXTRAÇÃO DOS GAGS

O processo de extração dos GAG's teve uma duração de 14 dias, por se tratar de um material altamente resistente, devido a sua composição, e conseqüentemente de difícil degradação. Todo o processo de hidrólise aconteceu em temperatura controlada de 60°C. No processo de extração dos GAG's, utilizou-se a proteólise, uma etapa fundamental quando se tem por objetivo liberar os GAG's da ligação com os peptídeos. No presente estudo a papaína foi a enzima utilizada para a hidrólise. Além da papaína que hoje é amplamente utilizada, há relatos de utilização de outras proteases. Optou-se pela papaína, devido a sua disponibilidade e baixo custo quando comparado às demais enzimas passíveis de utilização.

Existe uma série de fatores que irão influenciar na proteólise, como a afinidade da enzima e substrato, a temperatura ideal, o pH ótimo, a pureza da enzima, o método utilizado, bem como os tratamentos preliminares. No presente estudo foi trabalhado com um material de difícil degradação, o que pode ter contribuído para um tempo maior de digestão quando comparado a outros estudos.

Quando uma proteína é submetida em presença de um ácido forte, está se encontra abaixo do seu ponto isoelétrico (pI), assim a carga líquida total da molécula é positiva. Isso facilita a interação da molécula com os ânions provenientes de ácidos ocorrendo à precipitação. No presente estudo utilizou-se como agente precipitante o TCA (5%), e foi possível observar uma reação instantânea de precipitação a medida que o ácido era adicionado á solução após a digestão.

Arima et al., (2013), a fim de precipitar proteínas, também utilizou TCA na concentração 5% em seu estudo, já Nogueira (2019), utilizou TCA numa concentração de 10%. A diferença de concentração do TCA não irá influenciar na precipitação em si, pois não há relatos que apontem uma maior eficiência utilizando uma maior concentração. Sendo assim, optou-se por uma concentração menor com o intuito de otimizar o processo também em relação aos custos. A utilização do TCA como agente precipitante está associado principalmente à facilidade de utilização e sua praticidade, uma vez que nas literaturas consultadas não há relatos de possíveis interferências do método.

Uma segunda precipitação foi realizada, utilizando etanol e como resultado, obteve-se um rendimento bruto na amostra de escamas de 0,86%. O etanol é um solvente de baixa polaridade e isso faz com que os GAG's precipitem em sua presença. Volpi e Maccari (2009) testaram alguns solventes orgânicos (etanol, metanol e propanol), observou que a precipitação dos GAG's está relacionada com a porcentagem e o tipo de solvente utilizado. Ainda, as diferentes características dos GAG's irão influenciar na precipitação. Volpi e Maccari (2009) enfatizam que o etanol é o solvente mais indicado para precipitar GAG's sulfatados.

O rendimento de extração dos GAG's pode apresentar variações devido às espécies utilizadas e os métodos de extração (KRICHEN, et al., 2018). Nogueira (2019) obteve um rendimento de 0,18% de extrato bruto das vísceras de Pacu e 0,15% das vísceras de tilápia. Liu et al. (2018) extraiu GAG's de caramujos gigantes (*Fulica bowdich*) e obteve um rendimento final de 1% de peso seco. Em geral o rendimento de extração de polissacarídeos é muito variável devido a vários fatores, como condições ambientais, variação sazonal, fatores fisiológicos e métodos de extração.

CONCLUSÃO

As escamas de tilápia apresentaram teor de carboidratos de 0,80%. Apesar do baixo percentual, compostos sacarídeos com elevado valor comercial, poderiam ser isolados. O processo de extração dos GAGs teve um rendimento bruto de 0,86%, similar ao rendimento obtido para outras fontes de origem marinha.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Iniciação Científica da UTFPR.

REFERÊNCIAS

- PEIXE BR, 2020. **Associação brasileira de piscicultura. Anuário da piscicultura.** Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-2020> // Acesso em: 01 mai. 2020.
- FAO, 2020. **FAO aquaculture newsletter.** Roma, n. 61, p.60, 2020.
- PEIXE BR. **Associação brasileira de piscicultura. Anuário da piscicultura, 2019.** Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-peixe-br-da-piscicultura-2019/> Acesso em: 01 mai. 2020.
- VIDOTTI, R. M. **Tecnologias para o aproveitamento integral de peixes.** Macapá: Curso Técnica de Manejo em Piscicultura Intensiva, ed. 1, p. 01-22, 2011.

VIVIAN, M. M. P. S. **Caracterização e perspectivas de utilização de escamas da tilápia do nilo**. 2013. 60f. Mestrado (Zootecnia). Universidade Estadual do Paraná, Marechal Cândido do Rondon.

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.

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.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 140 p., 2017.

CARDOSO, L.E.; ERLICH, R. B.; RUDGE, M. C.; PECAROLI, J. C.; MOURÃO, P. A. A 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.

MOURA, Cristina. **Obtenção de glicosaminoglicanos de escamas de tilápia (Oreochromis niloticus)**. 2020. Mestrado (Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do paraná. Londrina. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5068/1/LD_PPGTAL_M_Moura%2C_Heloisa_Cristina_de_2020.pdf

ARIMA, K. et al. Amounts and compositional analysis of glycosaminoglycans in the tissue of fish. **Carbohydrate Research**, v. 366, p. 25-32, 2013.

KRICHEN F., et al. Isolation, purification and structural characteristics of condroitin sulfate from smooth hound cartilage: In vitro anticoagulant and antiproliferative properties, **carbohydrate polymers**, v.197, p. 451-459, 2018.

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

NOGUEIRA, A. V. et al. Viscera of fishes as raw material for extraction of glycosaminoclycans of pharmacological interest. **International journal of biological macromolecules**, v. 121, p. 239-248, 2019.

VOLPI, N., MACCARI, F. Structural characterization and antithrombin activity of dermatan sulfate purified from marine clam *Scapharca inaequalis*. *Glycobiology*, v. 19, p. 356–367, 2009.