



Obtenção e caracterização de glicosaminoglicanos de escamas de tilápia *Oreochromis niloticus*

Obtaining and characterizing glycosaminoglycans from tilapia scales *Oreochromis niloticus*

Thaís Rossetto Cordeiro da Silva¹, Evellin Alfaro-Balbinot², Cláudio Roberto Novello³, Alexandre da Trindade Alfaro⁴, Elisângela Düsman⁵

RESUMO

As escamas são um dos subprodutos da indústria da pesca que apresenta poucas opções de destinação, causando problemas ambientais e econômicos. Considerando o grande volume e potencial de produção de pescados do Paraná e do Brasil, esta pesquisa teve como objetivo extrair glicosaminoglicanos (GAGs) de escamas de tilápia. As escamas, fornecidas por uma indústria pesqueira no Sudoeste do Paraná, foram deslipídadas e a extração foi realizada com a enzima alcalase, seguida da precipitação com ácido tricloroacético 10 %. A amostra de GAGs bruto obtida foi fracionada por cromatografia de troca iônica e as amostras foram agrupadas de acordo com o perfil gráfico obtido na determinação do ácido hexurônico e a presença de metacromasia pela determinação de DMB (1-9 azul dimetilmetileno). O rendimento da extração foi de 16 % e o tempo total de extração foi de 4 dias. Foram agrupadas sete frações, sendo que as frações V e VI apontaram a presença de GAGs sulfatados, com presença de ácido hexurônico. Os resultados apresentados evidenciam o potencial para a utilização da escama de tilápia como matéria prima na extração de glicosaminoglicanos, sendo uma alternativa para o uso deste subproduto.

PALAVRAS-CHAVE: Escamas; extração; glicosaminoglicanos; rendimento.

ABSTRACT

Scales are one of the by-products of the fishing industry that have few options for disposal, causing environmental and economic problems. Considering the large volume and potential of fish production in Paraná and Brazil, this research aimed to extract glycosaminoglycans (GAGs) from tilapia scales. The scales, supplied by a fishing industry in the southwest of Paraná, were delipidized and extracted using the enzyme alkalase, followed by precipitation with 10% trichloroacetic acid. The crude GAG sample obtained was fractionated by ion exchange chromatography and the samples were grouped according to the graphic profile obtained in the determination of hexuronic acid and the presence of metachromasia by the determination of DMB (1-9 dimethylmethylene blue). The extraction yield was 16 % and the total extraction time was 4 days. Seven fractions were grouped together, with fractions V and VI showing the presence of sulfated GAGs, with the presence of hexuronic acid. The results presented show the potential for using tilapia scales as a raw material for extracting glycosaminoglycans, providing an alternative way of using this by-product.

KEYWORDS: Scales; extraction; glycosaminoglycans; yield.

¹ Bolsista da Fundação Araucária, Iniciação Científica e Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: thais.2020@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2751771595204944.

² Pós-Doutoranda em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental. Bolsista de Apoio Técnico. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: evebalbinot@gmail.com. ID Lattes: 9176133339178227.

³ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: crnovello@utfpr.edu.br. ID Lattes: 1320898705112948.

⁴ Docente no Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: atalfaro11@gmail.com. ID Lattes: 4939970055152393.

⁵ Docente no Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. E-mail: edusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 08342282115894459.



INTRODUÇÃO

As escamas são um dos subprodutos da indústria da pesca que apresenta poucas opções de destinação, causando problemas ambientais e econômicos. Segundo a Associação Brasileira da Piscicultura (PARLAMENTAR, 2023), o Paraná é o estado que mais produz tilápias, com mais de 34 % do volume total do país.

A indústria de peixes e frutos do mar é frequentemente deixada de fora das discussões sobre o desperdício de alimentos, mas esse setor não é exceção, pois gera grandes quantidades de subprodutos (PINELA et al., 2022). O processamento de resíduos dessas escamas representa uma opção sustentável para evitar a contaminação ambiental, e seus subprodutos oferecem diferentes benefícios. Transformar resíduos de peixes e frutos do mar em compostos valiosos que apresentam propriedades nutricionais e funcionais torna-se uma nova alternativa para indústria de alimentos e farmacêutica (ESPINALES et al., 2023).

Os glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos não ramificados compostos por unidades repetidas de ácidos urônicos e aminoácidos alternados. A maioria dos glicosaminoglicanos são ligados covalentemente às proteínas centrais para formar proteoglicanos (OETTERER, 2019). Os principais GAGs incluem heparina/sulfato de heparano e sulfato de condroitina/sulfato de dermatano e o ácido hialurônico, dentre eles o único que não possui agrupamento sulfato em sua estrutura (YIP et al., 2006).

Os GAGs interagem com vários ligantes, solúveis e insolúveis, e modulam um papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo câncer, infecções bacterianas e virais, inflamação, doença de Alzheimer e muitos outros (YAMADA e SUGAHARA, 2008). Embora a extração desses compostos seja um processo de alto custo e baixo rendimento, o material obtido é valorizado comercialmente e amplamente explorado no mercado biomédico (MORLA, 2020).

Considerando o grande volume e potencial de produção de pescados do Paraná e no Brasil, esta pesquisa tem como objetivo extrair e caracterizar GAGs de escamas de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

METODOLOGIA

EXTRAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS

As escamas de tilápia (Figura 1 - A), geradas como resíduos sólidos por uma indústria pesqueira do Sudoeste do Paraná, foi coletada após a etapa de evisceração. Elas foram lavadas em água corrente e, após, foram submetidas a duas etapas de deslipidação conforme metodologia de Balbinot-Alfaro et al. (2022), com modificações.

A extração dos GAGs foi realizada seguindo a metodologia de Nogueira et al. (2019) com modificações. Neste caso, as escamas secas foram trituradas em moinho, hidratadas em tampão fosfato pH 8,2 e, então, receberam solução da enzima alcalase (20 mg/mL), numa proporção de 5 mL para 100 mg de tecido seco. Os tecidos foram incubados por 48 h a 50 °C e centrifugados a 3200 rpm por 30 min e, após, o sobrenadante foi retirado. Aos sobrenadantes resultantes deste procedimento, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 10 %, por 20 min em banho de gelo e, em seguida, a amostra foi centrifugada 3200 rpm por 20 min e, após, o sobrenadante foi separado. Ao final desta etapa, o sobrenadante foi lavado com etanol sob agitação (2,5 vezes o volume do sobrenadante) e mantido em repouso por 24 h a uma temperatura de -20 °C. No dia seguinte a amostra foi centrifugada



3200 rpm por 20 min, após o sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante do processo foi congelado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizado, obtendo-se assim os GAGs bruto.

O extrato bruto contendo GAGs da escama de tilápia foi purificado e 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 (Figura 1). Após, o fracionamento foi realizado com gradientes de NaCl como fases móveis (0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0 e 4,0 mol).

O percentual de rendimento de extração foi calculado pela razão do peso seco dos GAGs totais pelo peso das escamas.

Figura 1 – cromatografia de troca iônica para purificação e fracionamento da amostra.



Fonte: A autoria própria (2023).

CARACTERIZAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS

A determinação dos GAGs sulfatados em presença do reagente de DMB (1,9 azul dimetilmetileno) foi realizada seguindo a metodologia de Farndale et al. (1986), com modificações.

A concentração do ácido hexurônico das frações foi determinada por método químico, utilizando-se o reagente colorimétrico carbazol, seguindo-se a metodologia de Dische (1946), com modificações.

As frações amostrais foram agrupadas de acordo com o perfil gráfico obtido na determinação do ácido hexurônico e GAGs sulfatados. As frações agrupadas foram dialisadas através de uma membrana de corte de 3.5 kDa usando água destilada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tempo total de extração dos GAGs usando a enzima alcalase foi de 4 dias. Moura et al. (2020), que também extraiu GAGs da escama de tilápia, utilizou a enzima papaína e obteve estes em 14 dias. No entanto, um tempo próximo ao relatado neste estudo foi alcançado por Karimzadeh (2018) e Abdulameer et al. (2021), que obtiveram GAGs das escamas de Binni e de Kutum em 3 dias, utilizando um processo químico sem o uso de



enzimas. De acordo com Rani et al. (2017) a extração de GAGs é um processo longo de custo elevado, baixo rendimento, mas com alto valor agregado.

O rendimento da extração foi de 16 %, sendo superior ao relatado na literatura por outros autores. Valor similar (0,8 %) foi alcançado por Moura et al. (2020), com escamas de tilápia e a enzima papaína para a extração.

Com relação a purificação da amostra de GAG obtida, por meio da coluna cromatográfica de troca iônica, obteve-se sete frações, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Separação das frações

Fração	Alíquotas (5 mL)	NaCl (Mol)
I	1 a 12	0,25
II	13 a 20	0,50
III	21 a 25	0,50 e 0,75
IV	26 a 38	0,75 e 1,00
V	39 a 49	1,00 e 2,00
VI	50 a 61	2,00 e 4,00
VII	62 a 66	4,00

Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados de DMB das frações apontam a presença de GAGs sulfatados, porém em baixa quantidade, tendo em vista que sua maior absorvância foi de 0,04 e outros picos foram negativos. Os picos majoritários desses sulfatados foram observados nas frações V e VI, as quais representam concentrações de 1,00 mol/L; 2,00 mol/L e 4,00 mol/L.

A quantificação da fração V de acordo com a curva padrão de carbazol foi de 17,29 µg de ácido hexurônico e, da fração VI 11,65 µg do mesmo composto. Os resultados para DMB foram de -2,11 µg para a fração V e -1,87 µg para a fração VI de GAG sulfatados. O valor negativo demonstra que não houve identificação ou que a quantidade presente na amostra é insuficiente para ser detectada por este método. O reagente DMB (1-9 Dimetilmetileno) é um corante catiônico, com propriedade metacromáticas, que se liga especificamente aos grupos sulfatados. Quando o grupo sulfato reage na presença do reagente de DMB, ocorre uma desprotonação dos grupos carboxil, gerando a metacromasia de azul para lilás (MORLA, 2019). Visualmente esta mudança de cor foi percebida nestas frações.

Pode-se sugerir que a amostra possui maior quantidade de ácido hexurônico, devido a presença de ácido hialurônico, que dentre os GAGs é o que não possui grupamento sulfato, justificando o valor negativo em DMB e a elevada concentração de ácido hexurônico.

O ácido hialurônico é um polissacarídeo aniônico composto de ácido urônico e hexosamina, Entre os GAGs, o ácido hialurônico tem uma das estruturas menos complexas, composto por unidades de dissacarídeo repetidas contendo N-acetilglucosamina, ácido β-D-glucurônico, ligados por meio de ligações glicosídicas alternadas β- (1 → 4) e β- (1 → 3) (KOONTZ, 2014).

Este trabalho não se finda nestes resultados apresentados. Será dada continuidade com análises de identificação dos glicosaminoglicanos que estão presentes na escama e a sua quantificação. Posteriormente serão analisados com relação ao seu potencial bioativo como antitumoral e anticoagulante.



CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho, evidenciam o potencial para a utilização da escama de tilápia, como matéria prima na extração de glicosaminoglicanos, utilizando um método de obtenção que extrai em um período menor que o convencional, com maior rendimento e menor custo. Os dados obtidos até o momento, demonstram que possivelmente o glicosaminoglicano presente na escama de tilápia é o ácido hialurônico.

A escama é um subproduto da industrialização de pescado de baixo valor econômico, que pode vir a ser uma nova fonte de ácido hialurônico, polissacarídeos de alto valor agregado, e que pode ser amplamente aplicado nas áreas médicas, farmacêuticas e estética. Uma alternativa nobre para o uso deste subproduto, retirando do meio ambiente sem prejudicar o ecossistema e agregando valor a escamas.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela Bolsa de Iniciação Científica, aos Novos Arranjos de Pesquisa e Inovação (NAPI-SUDOESTE) pela bolsa de apoio técnico, à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa Produtividade concedida à Profa. Dra. Elisângela Düsman (CNPq#305029/2022-3).

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ABDULAMEER, H.A.; ALDEBS, A.E.; HASSAN, N.F. Eficácia anticoagulante do glicosaminoglicano extraído da escama de Binni, *Mesopotamichthys sharpeyi* (Cyprinidae). **Jornal Internacional de Biologia Aquática**. v. 9, p. 344–349, 2021.

BALBINOT-ALFARO, E.; NOVELLO, C.R.; DUSMAN, E.; ALFARO, A.T.; BARDDAL, P.O.; ALMEIDA, I.V.; VICENTINI, V.E.P.; MARTINS., V. G. Bioactive properties of glycosaminoglycans extracted from Turkey (*Meleagris gallopavo*) by-products. **Food Bioscience**, v.46, p. 101–145, 2022.

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

ESPINALES, C.; ROMERO-PEÑA, M.; CALDERÓN, G.; VERGARA, K.; CÁCERES, P.J.; CASTILLO, P. Collagen, protein hydrolysates and chitin from by-products of fish and shellfish: An overview. *Heliyon*. V. 9, p. e14937, 2023.

FARNDAL, R.W.; BUTTLE, D.; BARRETT, A.J. FARNDAL. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimistry et Biophysica Acta**, v. 833, n. 2, p. 173–177, 1986.



KARIMZADEH K. Anticoagulant effects of glycosaminoglycan extracted from fish scales. **International Journal of Basic Science and Medicine**. v. 3, p. 72-77, 2018.

KOONTZ L. TCA precipitation. **Methods Enzymol**. V. 541, p. 3-10, 2014.

MORLA, S. Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 20, p. 1963, 2019.

MOURA, H.C.; NOVELLO, C.R.; BALBINOT-ALFARO, E.; DÜSMAN, E.; BARDDAL, H.P.O.; ALMEIDA, I.V.; VICENTINI, V.E.P.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; ALFARO, A.T. Obtaining glycosaminoglycans from tilapia (*oreochromis niloticus*) scales and evaluation of its anticoagulant and cytotoxic activities: Glycosaminoglycans from tilapia scales: anticoagulant and cytotoxic activities. **Food Research International**, v. 140, p. 110012, 2020.

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.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. [s.l: s.n.] International Journal of Biological Macromolecules, v. 121, p. 239–248, 2019.

Parlamentar, A. **Paraná é o maior produtor de pescados no Brasil**. Disponível em: <[PINELA, J.; FUENTE, B.; RODRIGUES, M.; PIRES, T.C.S.P.; MANDIM, F.; ALMEIDA, A.; DIAS, M.I.; CALEJA, C.; BARROS, L. Upcycling Fish By-Products into Bioactive Fish Oil: The Suitability of Microwave-Assisted Extraction. **Biomolecules**. v. 13, p.1, 2022.](http://www.assembleia.pr.leg.br/comunicacao/noticias/parana-e-o-maior-produtor-de-pescados-no-brasil#:~:text=O%20Paran%C3%A1%20%C3%A9%20o%20estado,do%20que%20no%20ano%20anterior.>. Acesso em: 17 de setembro de 2023.</p></div><div data-bbox=)

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.

YAMADA, S.; SUGAHARA, K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. **Current Drug Discovery Technologies**. v. 5, p. 289-301, 2008.

YIP, G.W.; SMOLLICH, M.; GÖTTE, M. Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. **Molecular Cancer Therapy**. V. 5, p. 2139-2148, 2006.