

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM HIDOGEL DE GELATINA OBTIDA DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA

Rayanne Maria Vitória Vasconcelos de Oliveira¹; Ranilson de Souza Bezerra²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas/Licenciatura- CCB – UFPE; E-mail: rayanne_oliveir@hotmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE E-mail: ransoube@uol.com.br

Resumo: A indústria pesqueira fornece, a partir de refugos do processamento industrial de pescados, moléculas bioativas em abundância, baixo custo e com enorme potencial biotecnológico, dentre elas, está a gelatina e quitosana. Com o objetivo de determinar o potencial de um hidrogel formado a partir destas duas biomoléculas, foi avaliada sua atividade através de ensaios antimicrobiano e antioxidante *in vitro*. A quitosana foi obtida do camarão *Litopenaeus vannamei* pelo método de autólise enzimática e derivatizado quimicamente para a obtenção de seu derivado hidrossolúvel, a O-carboximetil quitosana. A gelatina foi obtida a através do peixe Tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Os polímeros e o hidrogel obtido foram avaliados contra as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salonella enteritidis*. Para determinação do potencial antioxidante foi realizado o ensaio com o radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). A O-carboximetil quitosana, gelatina e o hidrogel não apresentaram atividade de inibição contra as bactérias avaliadas. No entanto, exibiram uma capacidade de sequestro do DPPH•-, de 41,65%±0.2; 88.42%±0.6 e 100 %, respectivamente, tornando-se importante a continuidade nas investigações para outras propriedades biológicas deste hidrogel, possibilitando um amplo espectro de aplicações na área alimentícia, biomédica, farmacêutica e cosmética.

Palavras-chave: antioxidante; derivados hidrossolúveis; resíduos do processamento de pescados

INTRODUÇÃO

Hidrogéis são redes de cadeias poliméricas hidrófilas que podem conter uma quantidade significativa de água, de 10% a mil vezes o seu peso seco. Hidrogéis fabricadas a partir de polímeros naturais são biomateriais de interesse particular na ciência dos alimentos e em aplicações biomédicas, tais como transportadores de drogas e nutrientes, encapsulação de matrizes de células e engenharia de tecidos (LUO et al., 2013). Polímeros naturais podem ser obtidos em abundância e baixo custo a partir de refugos do processamento da indústria pesqueira, subprodutos estes que são consideradas pelo mercado como “menos nobre”, porém são ricos em moléculas bioativas com amplo potencial de aplicabilidade biotecnológica (CAHÚ et al., 2012). Estes insumos produzidos geralmente são descartados sem tratamento adequado e, apesar de serem biodegradáveis, quando acumulados excessivamente no ambiente, causam um grande ônus ambiental, social e econômico (CAMPANHA-FILHO et al., 2007). Uma importante biomolécula que pode ser obtida dos subprodutos pesqueiros é a gelatina. A extração tradicional de gelatina é feita a partir da hidrólise parcial do colágeno animal contido na pele e ossos de mamíferos, principalmente suínos e bovinos. Entretanto, devido a problemas sanitários e por questões religiosas, a

busca por outras fontes de gelatina tem aumentado imensamente (SILVA, et al., 2011). Outra biomolécula que podem ser obtida a partir dos resíduos do processamento de pescados é a quitosana, polissacarídeo pseudonatural, obtido a partir da reação de desacetilação da quitina. Atualmente, a fonte economicamente mais viável de quitina é o subproduto da indústria pesqueira, obtido pelo processamento de camarões, caranguejos e lagostas (CAHÚ et al., 2012). A quitosana é um polímero atóxico, biodegradável, biocompatível, cujas propriedades vêm sendo exploradas em diversas áreas, no entanto, algumas aplicações da quitosana são limitadas, uma vez que esta é insolúvel em meio neutro, condição em que enzimas fisiológicas exercem sua atividade. Para solucionar este inconveniente, pesquisadores têm investido em estudos de modificações estruturais na quitosana a fim de melhorar sua solubilidade, ampliando, dessa forma, consideravelmente a sua gama de aplicações (ZHANG et al., 2010). Poucos estudos têm sido realizados sobre os efeitos biológicos de gelatina obtida de peixes e sua associação com outras moléculas bioativas, aliado a isso, o crescimento da comercialização de pescados, com consequente aumento da produção dos resíduos que podem se tornar danosos ao meio ambiente e à saúde pública, quando descartados inadequadamente, confere ao presente estudo, uma importância biotecnológica, social, econômica e ambiental. O objetivo deste trabalho é elaborar um hidrogel com gelatina, proveniente de resíduos da indústria pesqueira, possibilitando um amplo espectro de aplicações na área biomédica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste projeto, foram utilizados dois subprodutos do beneficiamento de pescado como matéria-prima: (1) carcaças do peixe *Oreochromis niloticus*, que foi coletada em locais de beneficiamento de pescado e (2) as cabeças de camarão *Litopenaeus vannamei*, que foram gentilmente cedidas pela indústria de processamento de pescados local (Netuno Ltda.). Após a coleta e descabeçamento, o material ainda fresco foi transportado em gelo para o laboratório de Enzimologia, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), acondicionado em sacos plásticos e preservado congelado (-20°C) até o momento de seu uso. Para extração do material gelatinoso, o material oriundo do peixe foi, inicialmente, submetido à hidrólise, para a remoção do tecido muscular e diminuição das partículas ósseas, através do procedimento descrito por Bezerra et al. (2005). O tratamento das cabeças de camarão também foi realizado pelo mesmo processo. Em seguida, os ossos foram tratados para a remoção das proteínas não-colágenas, sais e lipídios, e, por fim, a conversão de colágeno em gelatina, conforme as etapas propostas por Ahmad e Benjakull (2011). Para a dosagem da quantidade de gelatina na solução obtida, foi empregado o método do ácido bicinconínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina) (SMITH et al., 1985). A obtenção de quitosana foi realizada conforme Cahú et al. (2012), o qual compreende as fases: descalcificação, desproteínização, despigmentação, desacetilação e purificação; estas etapas consistem em procedimentos para remoção do cálcio, proteínas e pigmentos presentes na casca para a extração da quitina e transformação da mesma em quitosana. O derivado hidrossolúvel, O-carboximetil quitosana, foi obtido adicionando-se NaOH a 40% (m/v) em solução de ácido monocloroacético a 60°C durante um período de 3h. (RAMESH; VISWANATHA; THARANATHAN, 2004). O hidrogel foi preparado na proporção de 2% (m/v) de gelatina e de quitosana 1% (m/v). Cepas de bactérias da coleção do Departamento de Antibióticos (DA) da UFPE foram adquiridas para o ensaio de determinação da atividade antibacteriana: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) e *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414). O método de difusão em disco foi utilizado (BAUER; KIRBY, 1966), o inóculo foi preparado em solução salina (cloreto de sódio 0,85%). A turbidez da

suspensão bacteriana foi ajustada para 0,5 da escala de MCFarland. O inóculo foi distribuído, através de varredura utilizando *swab*, na superfície do meio de cultura. Após a adição de 20uL das amostras, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Para determinação do potencial antioxidante foi realizado o ensaio com o radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•-), conforme o método modificado de Young-Sook et al. (2011). As comparações estatísticas dos valores médios foi avaliada por análise de variância (ANOVA), utilizando a programa Origin (versão 8; GraphPad Software Inc., San Diego, EUA) e um valor de $P < 0,05$ foi considerado como o nível de significância estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos realizados permitiram a obtenção de 64,06g gelatina, a partir de 100g de ossos de *O. niloticus*. A partir dos procedimentos realizados para recuperação dos resíduos do camarão, foi obtida 30g de quitina, partir de 100g de carapaça seca de *L. vannamei*. Após a desacetilação da quitina, sua transformação em quitosana (Grau de Desacetilação calculado de 80%) e derivatização química, O-carboximetil quitosana foi produzida. Essa quitosana foi associada à gelatina obtida para a formulação de um hidrogel bioativo, para isto, foram preparadas soluções de quitosana a 1% (m/v), gelatina a 2% (m/v) e o hidrogel formulado com as duas biomoléculas na mesma concentração e proporção de 1:1. Os resultados do ensaio antimicrobiano indicaram a ausência desta propriedade nas soluções e hidrogel preparados, pois não houve indícios da presença de halo de inibição entre as amostras, nem nos diferentes microrganismos testados, que incluem o grupo das Gram-positivas e Gram-negativas. Jridi et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de gelatina a 4% (m/v), obtida de lula da espécie *Sepia officinalis*, também encontrou inibição contra as bactérias: *Salmonella entérica*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus*. Porém, ao testar o hidrogel formado com quitosana, sem modificação, a 2% (m/v) (oriunda do camarão *Penaeus kerathurus*) dissolvida em solução de ácido acético a 1% (v/v), obtiveram halos de inibição variando de 13 a 15 milímetros. Não é reportado na literatura estudos da atividade antimicrobiana com gelatina de peixes, nem com nenhuma outra espécie marinha, com exceção deste recente trabalho citado. Dessa forma, não pôde ser realizada uma discussão mais profunda dos resultados encontrados no presente trabalho. A atividade antioxidante de gelatina, O-carboximetil quitosana e hidrogel foram monitorados pela atividade de sequestro do radical DPPH•-, dentre as amostras avaliadas, o hidrogel exibiu maior capacidade sequestro, 100%, seguido da gelatina 88.42%±0.6 e por fim, a O-carboximetil quitosana, com 41.65%±0.2. Resultados semelhantes foram encontrados por Jridi at al. (2014) com gelatina a 4% (m/v), obtida de lula da espécie *Sepia officinalis* e quitosana a 2% (m/v) do camarão *Penaeus kerathurus*, valores de 7.24 ± 0.25, 1.24 ± 0.2 e 2.65 ± 0.1 foram encontrados para gelatina, quitosana e hidrogel, respectivamente. Os resultados mostraram que o hidrogel formado por gelatina e quitosana hidrossolúvel foi capaz de sequestrar radicais DPPH•- eficazmente, obtendo melhor resultado do que as biomoléculas atuando isoladamente. A introdução do grupo carboximetil na quitosana pode ter sido responsável pela doação do hidrogênio ao radical pelo polissacarídeo. No entanto, o mecanismo de ação da gelatina, ainda necessita ser elucidado, os relatos na literatura sobre sua atividade são praticamente inexistentes.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que os derivados obtidos a partir dos resíduos do processamento industrial de pescados possuem grande potencial antioxidante, no entanto, mais estudos são necessários com o emprego de outros diferentes métodos *in vitro* e o acréscimo de estudos *in vivo*, a fim de melhor caracterizar essa atividade e

entender os diferentes mecanismos de atuação. Apesar da ausência da atividade antimicrobiana avaliada, novas investigações precisam ser realizadas na busca de potenciais propriedades biológicas que este hidrogel possa conter. Dessa forma, este trabalho identifica a oportunidade de obter biomoléculas com propriedades interessantes, a partir de um material abundante e de baixo custo que são os subprodutos do processamento de pescados, possibilitando um amplo espectro de aplicações na área biomédica, assim também na farmacêutica, cosmética e alimentícia.

AGRADECIMENTOS

A autora gostaria de agradecer o suporte técnico e estrutural da UFPE e aos principais órgãos de fomento, que contribuíram para a realização do trabalho: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/UFPE pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Mehraj; BENJAKUL, Soottwat. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. **Food Hydrocolloids**. Hay Tai, p. 381-388. maio 2011.
- BAUER, A.W.; KIRBY, E.M.. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, Washington, p. 493-496. abril 1966
- BEZERRA, Ranilson de Souza et al. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**. Recife, p. 1829-1834. abril 2005.
- CAHÚ, Thiago Barbosa et al. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**. Recife, p.570-577. abr. 2012
- CAMPANA-FILHO, Sergio P. et al. Extração, estruturas e propriedades de α e β -quitina. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 3, n. 30, p.644-650, jan. 2007.
- JRIDI, Mourad et al. Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-chitosan composite edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**. Tunísia, p. 373-379. jun. 2014.
- LUO, Yangchao et al. Development of carboxymethyl chitosan hydrogel beads in alcohol-aqueous binary solvent for nutrient delivery applications. **Food Hydrocolloids**. Maryland, p.332-339. jun. 2013.
- RAMESH, H.P.; VISWANATHA, S.; THARANATHAN, R.N. Safety evaluation of formulations containing carboxymethyl derivatives of starch and chitosan in albino rats. **Carbohydrate Polymers**. Mysore, p. 58: 435-441. dez. 2004.
- SMITH, Paul K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**. Illinois, p.76-85. out. 1985.
- ZHANG, Kai et al. NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution. **Polymer**. Tharandt, p. 4698-4705. out. 2010.