

Atividade antioxidante do ácido hialurônico extraído da crista de frango

Antioxidant activity of hyaluronic acid extracted from chicken crest

Claudia Severo da Rosa^{1*} Solange Cristina Hoelzel^{II} Vanessa Bordin Viera^{II}
Pedro Manique Barreto^I Luiz Henrique Beirão^I

RESUMO

O ácido hialurônico (AH) é uma macromolécula com importância na área médica, na área farmacêutica e na indústria de cosméticos. O cordão umbilical e a crista de galo são os tecidos mais ricos neste polissacarídeo. O Brasil é um dos principais exportadores de frango do mundo; assim, o aproveitamento das cristas dos animais abatidos para a obtenção de AH se mostra particularmente atraente. Este trabalho teve como objetivos fazer a extração do AH da crista de frango e determinar a atividade antioxidante *in vitro*. Cristas de frangos secas e delipidadas foram submetidas à digestão proteolítica e posteriormente à precipitação com cloreto de cetilpiridínio (CPC). A atividade antioxidante foi determinada pelo método de seqüestro do radical 2,2 – difenil 1-picrilhidrazil (DPPH). A concentração de glicosaminoglicanos (GAGs) na crista de frango é de 14,9µg de ácido hexurônico /mg de tecido seco e o AH extraído apresentou ótima atividade antioxidante *in vitro*. Desse modo, o AH pode ser aproveitado como um resíduo das indústrias de processamento de frangos.

Palavras-chave: cristas de frangos, glicosaminoglicanos, extração.

ABSTRACT

The hyaluronic acid (HA) is an important macromolecule in medical and pharmaceutical areas as well as in the cosmetics industry. The umbilical cord and the chicken crest are two of the richest tissues in this polysaccharide. Since Brazil is one of the main chicken exporters in the world, the utilization of crests from slaughtered animals to obtain HA is particularly attractive. The present research aimed to extract hyaluronic acid (HA) from the crest and determine its antioxidant activity *in vitro*. Dry and delipidated chicken crest underwent proteolytic digestion and subsequent precipitation with cetylpyridinium chloride (CPC). Antioxidant activity was determined by the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

method. The glycosaminoglycans (GAG) concentration in the chicken crest was 14.9µg of hexuronic acid /mg of dry tissue and the extracted HA presented great antioxidant activity *in vitro*. Thus, HA may be used as a sub-product of poultry processing industries.

Key words: chicken crest, glycosaminoglycans, extraction.

INTRODUÇÃO

A avicultura industrial é uma das atividades agrícolas mais desenvolvidas no mundo. Impulsionada sobretudo pela necessidade de utilização de proteína de origem animal na dieta humana, a produção avícola no Brasil representa uma das mais importantes cadeias produtivas. Em 2002, a produção brasileira de carne de frango foi de 7,449 milhões de toneladas, o que representa um crescimento de 13,5% em relação ao ano de 2001 (NUNES et al., 2005). Em 2007 foram produzidas 8,988 milhões de toneladas de carne de frango (IBGE, 2008). Entre os países que se destaca no setor, o Brasil ocupa o terceiro lugar no mercado mundial de produção de carne de frango. Para que o setor mantenha o sucesso, é preciso investir em produtividade a baixo custo. Além disso, é necessário atenção especial à questão ambiental, destacando-se a importância do aproveitamento dos resíduos da indústria avícola (NUNES et al., 2005).

A crista de frango é rica em AH e, sendo um resíduo, é desprezada junto com a cabeça para a graxaria.

¹Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil. Email: claudiasr37@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}Curso de Nutrição, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS, Brasil.

O AH é constituído exclusivamente por unidades dissacarídicas repetidas contendo N-acetilglicosamina e ácido D-glicurônico. Embora o AH tenha a estrutura química menos complexa de todos os glicosaminoglicanos, as cadeias podem atingir massas molares de $10^5 - 10^7$ Da e possuem importantes aplicações nas áreas médica, farmacêutica e cosmética. O AH é usado no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos, na reposição do fluido sinovial e na liberação de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos, como meio hidratante e como sistema para encapsulação e liberação controlada de fármacos e cosméticos (OGRODOWSKI, 2006). Ele também é aplicado em lentes de contato (Beek et al., 2008) e em aplicações vasculares, como um copolímero com propriedades antitrombóticas (XU et al., 2008).

O fenômeno da longevidade, tanto no Brasil como nos demais países do mundo, foi alavancado pelas mudanças nos estilos de vida. A participação de fatores ambientais, os processos tecnológicos e científicos desenvolvidos na medicina, associados à melhora nas condições socioeconômicas mesmo nos países em desenvolvimento, foram e permanecem sendo os fatores determinantes de aumento de expectativa de vida (MOI, 2004).

O aumento acentuado do número de idosos, particularmente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, trouxe diversas conseqüências para a sociedade. A população idosa brasileira está mais sujeita a problemas de saúde, com o surgimento de enfermidades crônicas que acarretam baixa letalidade e às vezes alto grau de incapacidade, como é o caso da osteoartrite (MOI, 2004).

Preparações de AH intra-articulares são usadas para aumentar a viscosidade do líquido sinovial, que é reduzido em pacientes com osteoartrite (PEREIRA, 2002).

Vários autores sugerem que alguns GAGs possuem propriedade antioxidante, como o AH e o sulfato de condroitina, que inibem a peroxidação lipídica por quelarem metais de transição como o Cu^{2+} e o Fe^{2+} (ALBERTINI et al., 2000).

O aumento dos níveis de GAGs no plasma pode representar uma resposta biológica para produção de radicais livres. O uso desses componentes como agentes terapêuticos mostra resultados positivos em modelos animais experimentais (FRASER et al., 1997).

Este trabalho teve como objetivos extrair o AH da crista de frango e determinar a atividade antioxidante *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

As cristas usadas neste experimento foram fornecidas pelo frigorífico Pena Sul de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul (RS). As cristas foram coletadas na linha de abate, sendo 50% das cristas de frangos machos e 50% de fêmeas com idade de 48 dias. As cristas foram transportadas congeladas até Santa Maria-RS e permaneceram congeladas a -18°C até o início do experimento. As análises foram realizadas no laboratório de Tecido Conjuntivo da UFRJ e no laboratório de Bromatologia do Centro Universitário Franciscano.

Extração dos glicosaminoglicanos totais das cristas de frango

As cristas foram trituradas e colocadas em acetona para desidratação e delipidação. Posteriormente elas foram secas, pesadas e agrupadas, sendo utilizado em torno de 100g para cada extração ($n = 3$). Depois disso, foi realizada delipidação em solução clorofórmio/metanol (2:1, v/v) por 24h a 25°C . Os tecidos foram secos e hidratados em tampão de digestão (acetato de sódio 100mM pH = 5,0, cisteína 5,0mM e EDTA dissódico 5,0mM) na proporção de 2,0mL de tampão para 100mg de tecido seco. Após hidratação por 24h a 4°C , os tecidos receberam solução de papaína (20mg mL^{-1}), preparada na solução tampão de digestão descrita anteriormente, numa proporção de 0,5mL para 100mg de tecido seco. Posteriormente, os tecidos foram incubados por 24h a 60°C e centrifugados a 3200rpm por 30min e foi retirado o sobrenadante. O precipitado foi submetido à nova incubação com papaína, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, foi adicionado ao sobrenadante cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10%, numa proporção de 0,2mL para 100mg de tecido seco, que foi deixado em repouso por 24h a 25°C . A amostra foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 3,0mL de solução de NaCl 2,0M e etanol absoluto (100:15, v/v). Nessa amostra, foram adicionados dois volumes de etanol absoluto. Depois, ela foi deixada em repouso por 24h a -16°C . Seguiu-se centrifugação, descarte do sobrenadante e lavagem do *pellet* uma vez com 10mL de etanol 80%. Seguiu-se nova centrifugação e secagem do *pellet* por 24h a 25°C (CARDOSO et al., 1992).

Dosagem de ácido hexurônico (método de Carbazol)

A concentração do ácido hexurônico da solução contendo AH foi determinada por meio de método químico, utilizando o reagente colorimétrico Carbazol (DISCHE, 1946). Esse método baseia-se no

desenvolvimento de cor pela ação de compostos orgânicos como o reagente Carbazol. A dosagem de ácido hexurônico foi realizada com 200µL de amostra, aos quais se adicionou 1,0mL de ácido sulfúrico com borato. Depois disso, a amostra foi aquecida por 10min a 100°C e resfriada à temperatura ambiente e recebeu 40µL de carbazol. Logo depois, ela foi aquecida novamente por 12min a 100°C e resfriada à temperatura ambiente. A leitura foi realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 525nm (Ultrapesc 3100 pro – *Amersham Biosciences*). A concentração do AH foi determinada por meio de uma curva de calibração previamente construída com o AH padrão (*Vinovo Biochemistry*) tomado como referência. A curva padrão foi feita com diferentes concentrações de glicuronolactona [0,5mg mL⁻¹]: 5,0-15µg. A concentração de AH foi calculada a partir do conteúdo de ácido hexurônico x 1,95 (SWANN, 1968).

Fracionamento dos glicosaminoglicanos

Os glicosaminoglicanos da crista de frango foram aplicados em uma coluna de troca iônica Mono Q (HR 5/5) acoplada a um sistema de *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) (*Amersham Pharmacia Biotech*), equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM, pH 8,0, e submetidos a um gradiente linear de NaCl (0 a 1,5M) no mesmo tampão. O fluxo da coluna foi de 1mL min⁻¹ e foram recolhidas frações de 0,5mL. As mesmas foram avaliadas pelo conteúdo de ácido hexurônico e pela metacromasia produzida pelos glicosaminoglicanos sulfatados na presença de azul de dimetilmetileno (DMB). A concentração de sal foi estimada pela condutividade.

Determinação da atividade antioxidante - Método de captação do radical DPPH (2,2 - difenil 1-picrilhidrazil)

A atividade antioxidante foi determinada pela redução do radical estável DPPH (2,2 - difenil 1-picrilhidrazil) e pelos antioxidantes presentes na amostra, utilizando-se concentrações finais de 500, 250, 100, 50, 10µg mL⁻¹ em solução aquosa. Em um tubo de ensaio, foi adicionado um volume de 2,5mL da amostra e em seguida adicionou-se 1,0mL de solução de DPPH 0,3mM em etanol. Após 30 minutos, foram realizadas as leituras das amostras em absorvância de 518nm. A solução de DPPH (1,0mL; 0,3mM) mais etanol (2,5mL) foi usada como controle (KNATT et al., 2008). A atividade antioxidante foi calculada com o auxílio da fórmula (1).

$$\% \text{ seqüestro de radicais livres} = 100 - [(A_A - A_C) / A_C] \times 100$$

Onde: A_A = absorvância da amostra

A_C = absorvância do controle

Análise estatística

Para uma análise comparativa da atividade antioxidante do AH extraído de cristas de frango e do AH padrão, aplicou-se Análise de Variância em um nível de significância de 1%, com auxílio do software Microsoft Office Excel (BRAULE, 2001).

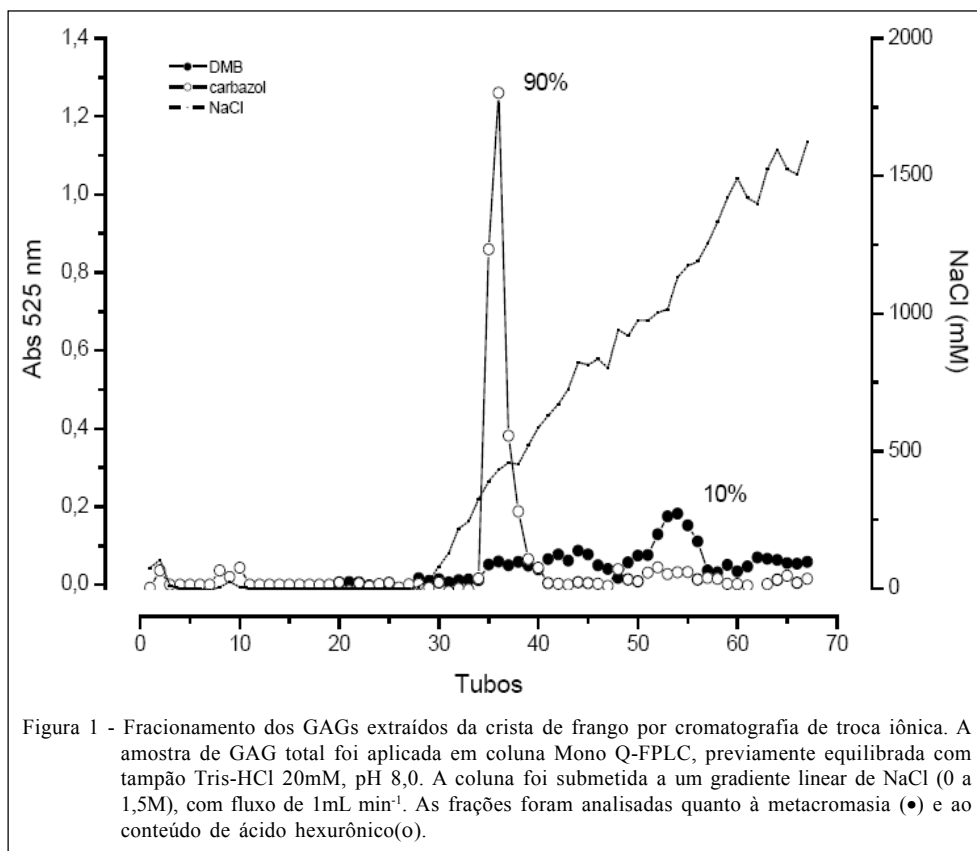
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração dos GAGs nas cristas de frango

O material seco e delipidado obtido das cristas de frango correspondeu a ≅ 16% do peso líquido das mesmas. A concentração dos glicosaminoglicanos totais foi de 14,9µg de AH mg⁻¹ de tecido seco. O valor é bem inferior ao relatado por NAKANO & SIM (1989; 1991), de 42,1µg ácido hexurônico mg⁻¹ de tecido seco. Entretanto, nesse estudo os glicosaminoglicanos totais das cristas foram extraídos de animais de 52 semanas (364 dias), enquanto que no presente estudo os animais tinham 48 dias, portanto, animais bem mais jovens. NAKANO et al. (1994) reportaram que o teor de ácido hexurônico no tecido vermelho situado abaixo do bico de galos de 52 semanas é de 19,1µg mg⁻¹ de tecido seco, valor próximo ao encontrado neste estudo para as cristas de frango.

Segundo NAKANO & SIM (1991), as cristas de animais mais velhos e animais machos possuem quantidades maiores de ácido hialurônico. Além disso, o escaldamento das cristas pode diminuir a concentração de AH e o método de extração também pode influenciar sua obtenção (SZIRMAI, 1956; BALAZS et al., 1958; SWANN, 1968). Mesmo assim, em função da quantidade de frangos abatidos nos frigoríficos, a extração do AH pode vir a ser compensadora.

O extrato de GAG total das cristas de frango foi fracionado em uma coluna Mono-Q. Pode-se observar (Figura 1) um pico majoritário, correspondendo a ≅ 90% do total de ácido hexurônico da amostra, eluindo com ~ 400mM de NaCl, e não exibindo metacromasia significativa. Essas propriedades são características do AH quando aplicado nesta coluna (CARDOSO et al., 1992). Pôde-se também observar uma fração exibindo propriedade metacromática, eluída com concentração de NaCl superior a 1M, indicando a presença de GAGs sulfatados na amostra analisada. As cristas obtidas de animais de 48 dias apresentaram 14,9µg de ácido hexurônico/mg de tecido seco. Assim, a quantidade obtida de AH é calculada multiplicando o valor encontrado de ácido hexurônico por 1,95 e considerando um rendimento de 90%, que resulta em 26,15µg de ácido hialurônico mg⁻¹ de tecido seco. Em



2005, foram abatidas 17.566.405 cabeças dia⁻¹ de frangos no Brasil, segundo dados da Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), União Brasileira de Avicultura (UBA), Associação Fluminense de Avicultura (AFA) (OLIVO & OLIVO, 2006). Levando-se em conta que cada crista pesa em média 3g, são aproximadamente 52,7 toneladas apenas deste resíduo por dia que poderia ser utilizado para extração de aproximadamente 1,4 toneladas de AH. Vale ressaltar que todo o AH usado no Brasil é importado a um custo de US\$ 65,00 100mL⁻¹ (OGRODOWSKI, 2006).

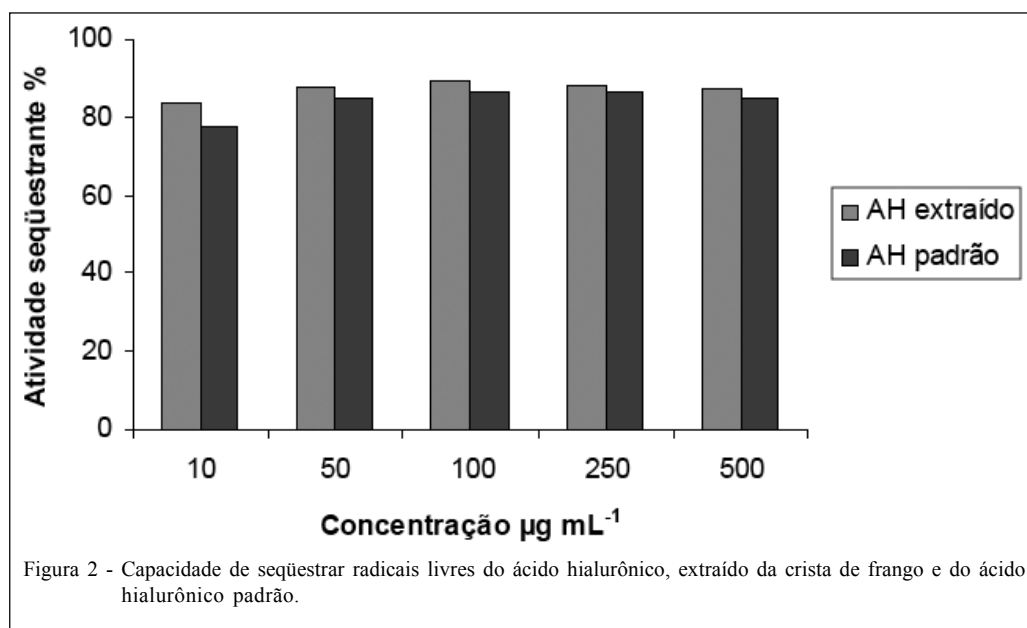
Atividade antioxidante

A capacidade de seqüestrar o radical DPPH pelo AH extraído da crista de frango encontra-se na figura 2. O AH extraído da crista de frango possui forte atividade para seqüestrar o radical DPPH, não apresentando diferença significativa ($P > 0,01$) entre o AH extraído e o AH padrão (Figura 2). O efeito seqüestrante do AH extraído variou de 83,9% na concentração de 10 μ g mL⁻¹ a 87,3% na concentração de 500 μ g mL⁻¹ e o AH padrão variou de 77,63% na concentração de 10 μ g mL⁻¹ a 85,1% na concentração de 500 μ g mL⁻¹.

Esses valores mostram que o AH extraído pode ser usado como um antioxidante natural. Além de seu uso na medicina, pode ser usado pela indústria alimentícia como um ingrediente natural com propriedade antioxidante.

Estudos realizados por Campo et al. (2004) mostraram a atividade antioxidante do AH e C4S (4-sulfato de condroitina) em ratos induzidos com CCl₄, provocando fibrinogênese. O AH e o C4S em altas concentrações (25mg mL⁻¹) agiram como potentes antioxidantes, atenuando significativamente a peroxidação lipídica. A provável hipótese sobre o mecanismo pelo qual o AH e o C4S reduzem radicais livres está baseada nas suas estruturas. Os dois polímeros apresentam estruturas com ligações cruzadas, com grupos carboxílicos em algumas posições. Esses grupos carboxílicos podem interagir com íons metálicos como Cu²⁺ ou Fe²⁺, que são responsáveis pela iniciação da reação de Fenton. Essas moléculas podem funcionar como quelantes de metais.

AI et al. (2007) determinaram a atividade antioxidante do chitosan isolado de larvas de moscas *in vitro* pelo método de DPPH em várias concentrações e verificaram que o chitosan possui capacidade de



seqüestrar radicais livres. O efeito do quitosân sobre o radical livre DPPH foi de 57,1% na concentração de 0,5mg mL⁻¹, valor inferior ao encontrado neste experimento pelo ácido hialurônico na menor concentração (10µg mL⁻¹), que foi de 83,94%.

Pesquisas recentes realizadas por KNATT et al. (2008) mostraram que a combinação de quitosân e extrato de hortelã, na mesma proporção, age como potente antibacteriano e agente antioxidante e pode ser usada para preservar e aumentar o tempo de vida de prateleira de carnes e produtos cárneos. Como o quitosân e o AH são polímeros com estruturas semelhantes, é provável que o AH adicionado a produtos cárneos possa também agir como antioxidante.

CONCLUSÕES

O aproveitamento das cristas de frango pela indústria avícola mostra-se viável devido ao grande número de abates diários e ao rendimento em AH. O AH extraído da crista de frango mostrou forte atividade antioxidante *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AI, H. et al. Preparation and biological activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica*. **Carbohydrate Polymers**, San Diego, v.72, n.3, p.419-423, 2007.

ALBERTINI, R. et al. The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation, **International Journal Molecular Medicine**, Athens, v.6, n.2, p.129-136, 2000.

BALAZS, E. et al. C¹⁴ Assays and autoradiographic studies on the rooster comb. **Journal Biophysica and Biochemistry Cytology**, Baltimore, v.5, n.2, p.329-326, 1958.

BEEK, M. et al. Hyaluronic acid containing hydrogels for the reduction of protein adsorption. **Biomaterials**, Orlando, v.29, n.7, p.780-789, 2008.

BRAULE, R. **Estatística aplicada com Excel para cursos de administração e economia**. S. Paulo: Campus, 2001, 199p.

CAMPO, G. et al. The antioxidant and antifibrogenic effects of the glycosaminoglycans hyaluronic acid and chondroitin-4-sulphate in a subchronic rat model of carbon tetrachloride-induced liver fibrogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, San Diego, v.148, n.3, p.125-138, 2004.

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

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

FRASER, J. et al. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **Journal International Medical**, Baltimore, v.242, n.1, p.27-33, 1997.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. 2008. Capturado em 23 de abril de 2008. Online. Disponível na Internet em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate_leite_couro_ovos_200704_1.shtml

- KNATT, S. et al. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, Nova York, v.107, n.2, p.845-852, 2008.
- MOI, R.C. **Envelhecimento do sistema tegumentar: revisão sistemática da literatura**. 2004. 85f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Programa de Pós-graduação em Enfermagem, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- NAKANO, T. et al. A simple rapid method to estimate hyaluronic acid concentration in rooster comb and wattle using cellulose acetate electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, California, v.42, n.12, p.2766-2768, 1994.
- NAKANO, T.; SIM, J.S. Chemical composition of glycosaminoglycan fractions from the comb and wattle of single comb white leghorn roosters. **Poultry Science**, California, v.70, n.12, p.2524-2528, 1991.
- NAKANO, T.; SIM, S. Glycosaminoglycans from the rooster comb and wattle. **Poultry Science**, California, v.68, n.9, p.1303-1306, 1989.
- NUNES, R. et al. Valores energéticos de subprodutos de origem animal para aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.4, p.1217-1224, 2005.
- OGRODOWSKI, C.S. **Produção de ácido hialurônico *Streptococcus*: estudo da fermentação e caracterização do produto**. 2006. 121f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- OLIVO, R.; OLIVO, N. **O mundo das carnes: ciência, tecnologia & mercado**. 3.ed. Criciúma: edição do autor, 2006. 209 p.
- PEREIRA, I.A. Terapêutica da osteoartrose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v.42, n.1, p.77-82, 2002.
- SWANN, D. Studies on hyaluronic acid I. The preparation and properties of rooster comb. **Biochimica et Biophysica Acta**, USA, v.156, n.1, p.17-30, 1968.
- SZIRMAI, J.A. Studies on the connective tissue of the cock comb. I. Histochemical observations on the ground substance. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, Washington, v.4, n.2, p.96-106, 1956.
- XU, F. et al. The haemocompatibility of polyurethane-hyaluronic acid copolymers. **Biomaterials**, Tokyo, v.29, n.2, p.150-160, 2008.