



EXTRAÇÃO DE GLICOSAMINOGLICANOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NA MEMBRANA DA CASCA DE OVO

Fabiano Passos Rocha
Ruandeson Santos Soares Machado
Stefany Paola Cardoso Navea
Vitor Vinicius Rodrigues Tesser
Orientadora: Prof.^a Thais Taciano dos Santos

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de glicosaminoglicanos presente na película interna da casca do ovo por meio da metodologia de extração por precipitação por etanol, baseando-se em trabalhos de extração de mucopolissacarídeos presente na crista do galo, visando a obtenção do ácido hialurônico (AH), o único não sulfato do grupo de glicosaminoglicanos, buscando a comprovação da possibilidade de obtenção do AH na película da casca do ovo. As amostras foram analisadas através da técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), identificando os grupos funcionais N-acetil, álcool e ácido carboxílico resultado das deformações expressa nas bandas geradas no gráfico.

Palavras-chave: Ácido hialurônico (AH). Glicosaminoglicanos. Casca de ovo.

ABSTRACT

This work aimed to supply glycosaminoglycans present in the internal film of the eggshell through the extraction methodology using ethanol derivatives, based on work on the extraction of mucopolysaccharides present in the rooster's comb, obtaining the delivery of Hyaluronic Acid (HA), the only non-sulfate in the group of glycosaminoglycans, seeking to prove the possibility of obtaining HA in the eggshell film. The samples were verified using the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) technique, identifying the functional groups N-acetyl, alcohol and carboxylic acid as a result of the deformations expressed in the bands generated in the graph.

Keywords: Hyaluronic acid (HA). Glycosaminoglycans. Eggshell.

¹ Curso Técnico em Química – ETEC Irmã Agostina
Av. Feliciano Correa s/n – Jardim Satélite - CEP 04815-240 - São Paulo – Brasil *
acidialuronico@gmail.com

Recebido em: 01/12/2023

Apresentado à banca em: 07/12/2023

1. INTRODUÇÃO

Utilizar a casca de ovo como matéria-prima para extração do ácido hialurônico (AH) provém do fácil acesso ao material já que a casca de ovo é um resíduo orgânico descartado diariamente, pois o ovo é um alimento muito consumido na sociedade brasileira. De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2007, cada brasileiro consumia 131 ovos por ano. Entretanto, este índice praticamente dobrou. Atualmente consome-se 257 unidades de ovo anualmente, conforme o último levantamento setorial realizado em 2021. O descarte inapropriado pode trazer consequências ambientais como a compactação do solo pelo excesso de cálcio, como diz Felipe De Lavor Dias (2021).

A justificativa para essa pesquisa é apresentar o potencial de reaproveitamento da casca do ovo, dado suas inúmeras vantagens químicas como sua casca rica em carbonato de cálcio que pode ser usado como fonte nutricional para humanos (MILBRADT et al, 2015), sua capacidade para produção de tijolo ecológico (AMARAL e DE HOLANDA, 2011), buscando também demonstrar o que se pode extrair de sua membrana, que neste caso é a obtenção dos glicosaminoglicanos e a identificação da molécula de AH ($C_{14}H_{21}NO_{11}$).

A casca do ovo possui uma camada composta por cerca de 95% de carbonato de cálcio e outra camada interna, a membrana, com 5% de proteínas. Sua composição, contendo: sulfato de queratina e dermatana; os aminoácidos, como: lisina, prolina, alanina, cisteína e fenilalanina (OLIVEIRA; BENELLI; AMANTE, 2009). É na camada de proteínas que se encontra o grupo de interesse, os glicosaminoglicanos, incluindo entre eles o único não sulfatado, o AH (LAURENT, 2002).

Os glicosaminoglicanos são cadeias polissacarídicas não-ramificadas, compostas de unidades repetidas de dissacarídeos. São chamados glicosaminoglicanos 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). Devido aos grupos sulfato e carboxila, os glicosaminoglicanos são carregados negativamente. Estão divididos em quatro grupos principais de acordo com a molécula do açúcar, o tipo de ligação entre eles e o número e a localização dos grupos sulfato: ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de dermatana, sulfato de heparana e sulfato de queratina. (GARTNER; HIATT, 2003).

O *Hialuronano*, comumente conhecido como hialuronato ou ácido hialurônico é um polissacarídeo aniônico solúvel em água composto por unidades dissacarídicas repetidas, contendo N-

acetil-glicosamina e ácido D-glucurônico ligados por ligações glicosídicas e alternadas (OGRODOWSKI, 2006). É naturalmente produzido pelo corpo dos animais, incluindo humano, através de células de fibroblasto presente no organismo. E está presente nas articulações do corpo humano, sendo responsável pelo preenchimento de regiões faciais, tendo como função manter o desempenho do fluido sinovial das articulações, olhos e cartilagens. O AH oferece resistência à compressão em razão de suas propriedades elásticas, fazendo com que proteja a pele de danos existentes no meio exterior. Segundo os estudos de BERNARDES et al., (2018) a presença de AH no organismo humano é decrescente com o passar do tempo, de modo que a proporção presente no organismo de uma pessoa idosa é bem inferior, comparado com um organismo de uma pessoa mais jovem. (CALDAS PAN; et al, 2013)

O AH é encontrado em tecidos conjuntivos de animais, principalmente mamíferos, sendo esta uma das principais fontes do composto, podendo ser extraído da pele, tendões, cordão umbilical, olhos e até mesmo da crista do galo. Existem vários métodos de extração do AH destas fontes, porém para ser extraído necessita de processos de limpeza e purificação laboriosos para sua utilização em aplicações específicas, por exemplo preenchimento facial. Isso faz com que o processo, além de muito trabalhoso, gere bastante risco de contaminação. Essa dificuldade estimula o estudo de novas fontes de obtenção do AH. Atualmente o método mais utilizado para a produção comercial de AH é a fermentação bacteriana por cepas de *Streptococcus*. Este método envolve o uso de bactérias que são capazes de produzir grandes quantidades de AH, que é então isolado e purificado a partir desta cultura (OGRODOWSKI, 2006).

De acordo com a ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, o crescimento deste mercado nos últimos 5 anos foi de 567%. Hoje a indústria de cosmético vem buscando bastante a utilização de matéria-prima orgânica, visando a sustentabilidade. A obtenção do AH a partir da casca do ovo visa atender tanto a demanda ambiental pela reciclagem desse resíduo quanto a atender a demanda comerciais.

2. METODOLOGIA

Foi empregado a técnica de extração por precipitação utilizando o Etanol como reagente orgânico, relacionando os resultados com os obtidos através dos espectros no infravermelho gerado nos experimentos de Claudia Severo da Rosa (2008) que efetuou o processo de extração do AH a partir da crista do galo e o relacionou com os espectros de um AH padrão (Vino Biochemistry).

Os dados do preparo da amostra estão inseridos na metodologia de acordo com o processo.

2.1. MATERIAIS E REAGENTES

Para a realização das etapas foram utilizados os seguintes equipamentos: Espectrômetro no Infravermelho (Perkin Elmer®), balança analítica (GEHAKA®), estufa (NOVATECNICA®), Triturador Mixe (ELGIN®) e agitador magnético (Alpha Life Science®).

Os reagentes necessários estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Reagentes.

REAGENTES		
NOME	FÓRMULA	MARCA
Água Destilada	H ₂ O	-
Tampão Fosfato	Na ₂ HPO ₄ +NaH ₂ PO ₄	Synth
Etanol Absoluto	C ₂ H ₆ O	Itajá

Todas as vidrarias e reagentes utilizados na prática foram fornecidos pela estrutura da Escola Técnica Irmã Agostina, o equipamento de Infravermelho (FTIR) utilizado foi fornecido pela Universidade Federal de São Paulo-Campus Diadema.

2.1.1. MATERIAIS ORGÂNICOS

As películas das cascas de ovo utilizadas para desenvolvimento das amostras no experimento foram obtidas em HortiFrut Fruto Verde® (São Paulo, Brasil) e utilizadas de imediato. A cartela de comprimidos de protease *Asprgillus niger* (Glutezym) foi adquirida na farmácia Drograria Raia® (São Paulo, Brasil)

2.2. MÉTODOS

Baseou-se na pesquisa bibliográfica dos métodos utilizados por D. A. Swann, exposto por Severo da Rosa em 2008, as primeiras extrações de AH a base de água e álcool da crista do galo. (SEVERO DA ROSA, 2008) (SOUZA et al 2023).

2.2.1. PREPARO DOS EXTRATOS

De acordo com a técnica de D.A. Swann inicia-se o processo formando uma solução do material coma solução extratora. Separou-se o total de 5 películas frescas retirada manualmente da casca do ovo, utilizadas de imediato amostra, deixando-as num béquer para secar em estufa a 60°C por aproximadamente 4 horas. As películas, após seca, foram trituradas com mixer e deixadas

no béquer contendo 25 mL de água destilada. A solução foi armazenada na geladeira por 48 horas, em temperatura de aproximadamente 9°C. Em seguida separou-se o sobrenadante do corpo de fundo por meio de filtração simples.

Ao sobrenadante, foi adicionado por amostra 75mL de etanol 99,5%, numa proporção 3:1. Foi deixada novamente na geladeira por aproximadamente 48h. Após esse processo foi separado o sobrenadante, deixando um gel precipitado branco, onde encontra-se a substância de interesse, os glicosaminoglicanos. Em seguida foi adicionado 25mL de solução tampão de fosfato pH=7, numa proporção 1:1 com a amostra. Logo em seguida foi acrescentado à solução o conteúdo de uma capsula de Protease de *Asprgillus niger* (Glutezym). Após essa etapa, deixou-se a solução em repouso por aproximadamente um dia. Ao fim, foi deixado em estufa para secagem completa da amostra. (GIBIAN, 1996; IGNATOVA, GUROV, 1990).

2.2.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A amostra com os glicosaminoglicanos foi seca em estufa, em seguida levada pelo professor Alexandre de Jesus Barros, para a Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, onde o respectivo teste foi realizado. O equipamento efetua a leitura na faixa de 400 a 4.000 cm⁻¹, possibilitando a identificação da estrutura do composto.

O processo foi iniciado homogeneizando 1mg de amostra em 10mg de brometo de sódio (NaBr) utilizando um pistilo e almofariz por aproximadamente 5 minutos. Após o tempo decorrido, está foi prensada em um pastilhador por pressão até formar uma pastilha translúcida, por conseguinte foi realizada a leitura pelo espectrofotômetro no infravermelho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado obtido na primeira parte da metodologia, após a filtração simples da amostra, obteve-se uma solução transparente, inicialmente, decorrente dos grupos N-acetil e carboxila da molécula que a proporciona um caráter polar ao AH efetuando ligações de hidrogênio com a água (SEVERO DA ROSA, 2008).

Com a adição do etanol, obteve-se como resultado uma solução opalescente devido característica pouco polar do reagente em relação a água. O etanol não reage com AH, precipitando-o, obtendo uma solução de coloração leitosa, indicando que outros composto precipitaram além do AH como por exemplo os ácidos nucleicos (SEVERO DA ROSA, 2008).

Devido ao caráter poliônico do AH, ele é capaz de associar a sua estrutura proteínas, desenvolvendo complexos proteicos. Para remover esses compostos, adicionou-se a protease para hidrolisar as proteínas presentes na amostra, aumentando o rendimento da extração final. O tampão fosfato neutro adicionado junto a protease efetua o controle do pH para evitar a hidrólise da molécula de AH, pois ela é sensível a alteração do pH (SEVERO DA ROSA, 2008).

A secagem da amostra possibilita sua compactação em comprimido e ser possível a análise por FTIR que irá efetuar uma deformação específica em número de onda específico e gerar uma banda no gráfico de relação Transmittância % x Número de Onda (cm^{-1}).

O resultado apresentado pelo espectrômetro indicou as deformações das ligações demonstradas na tabela 4.

Tabela 4: resultados das bandas geradas no espectro no infravermelho.

ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO		
LIGAÇÃO	NÚMERO DE ONDA (cm^{-1})	DEFORMAÇÃO
O-H e N-H	3400-3420	Estiramento
C=O	1620 e 1640	Estiramento
C-N	1270	Estiramento
C-O	1050-1100	Estiramento

Sendo o AH um composto de estrutura conhecida, buscou-se identificar deformações que coincidiram com as esperadas para a molécula, como:

C-O: álcool e ácido carboxílico de 1100 a 1000 cm^{-1} ;

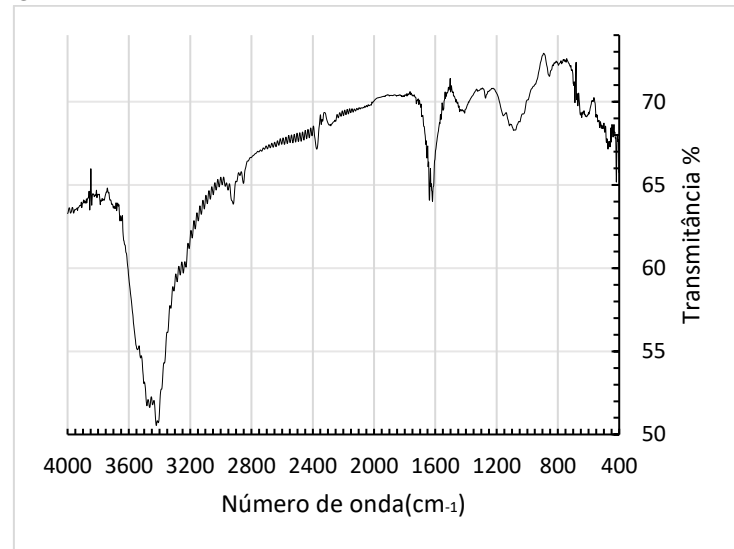
C-N: aminas de 1300 a 1200 cm^{-1} ;

C-H: alcanos com C sp^3 de 2900 cm^{-1} ;

N-H: 3460 a 3420 cm^{-1} .

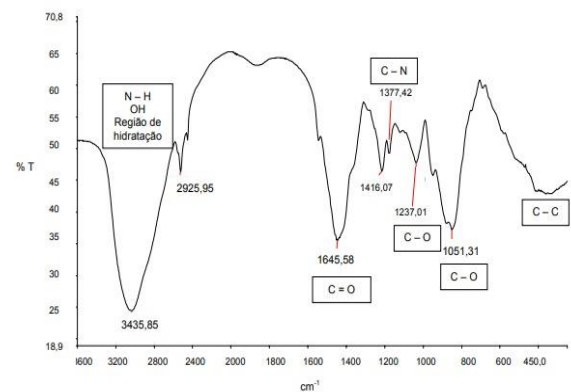
As bandas geradas no espectro da amostra, apresentam deformações em faixa semelhante aos encontrados no gráfico 2 e 3 por Cláudia Severo (2008), que realizou análise do AH extraído da crista do galo, comparando-o com um espectro do AH padrão; e os apresentados por Pavia em seu livro Introdução a Espectroscopia (2010, pag. 18; pag. 29).

Gráfico 1: FTIR da AH extraído da membrana do ovo



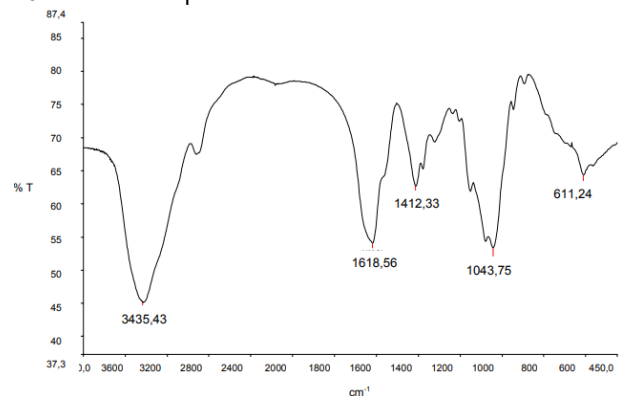
Fonte: autores (2023)

Gráfico 2: FTIR do AH extraído da crista do galo



Fonte: Severo da Rosa (2008)

Gráfico 3: FTIR do AH padrão.



Fonte: Severo da Rosa (2008)

Os espectros da amostra apresentam transmittância do AH extraído menor que na amostra padrão, indicando que existem grupos externos na molécula do AH extraído que estão interagindo com sua estrutura, fato justificado pela

incompleta purificação da amostra analisada. O etanol se apresentou como um solvente não indicado para extrações de alta pureza, pois precipita junto outras substâncias (SEVERO DA ROSA, 2008).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Da metodologia testada, com a técnica de identificação por espectroscopia do AH, presente nos glicosaminoglicanos extraídos da película da casca do ovo, apresentou-se positiva, uma vez que os espectros apresentados na análise do infravermelho, demonstraram semelhança com as análises de outros autores que efetuaram a comparação entre o AH extraído com o AH padrão. Assim, tendo em vista esses resultados, condizendo com o objetivo do trabalho de adequar uma técnica simples e pouco laboriosa de extração de Ácido Hialurônico a partir da reciclagem da casca do ovo.

Por fim, acredita-se que o trabalho não teve potencial totalmente explorado, uma vez que possui algumas limitações, como falta de tempo e recursos para análise, assim não se consegue encerrar o tema abordado. Com base no estudo desenvolvido e nos resultados obtidos neste trabalho, tem-se a intenção de abrir a discussão para ampliar o conhecimento científico, ficando algumas sugestões para trabalhos futuros, temas como: Determinação da atividade antioxidante do Ácido Hialurônico extraído da membrana do ovo; Possíveis aplicações do AH derivado da película da casca do ovo em cosméticos; Concentração de glicosaminoglicanos na película da casca do ovo e a massa molar do Ácido Hialurônico extraído, assim por conseguinte.

5. Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter permitido que tivéssemos saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

A nossa família que nunca nos deixou desanimar.

A Prof.^a Orientadora Thais Taciano dos Santos. Por auxiliar-nos durante o processo.

Ao Prof. Alexandre de Jesus Barros por conceder seu tempo e disponibilizar equipamento para análise

Agradeço a oportunidade de fazer parte de uma instituição como a Escola Técnica Irmã Agostina. Aos demais professores, que nos auxiliou durante esse trabalho e pelos ensinamentos que

nos permitiram entender e apresentar um melhor desempenho na nossa formação.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, Mateus Carvalho; DE HOLANDA, José Nilson França. **Incorporação de Resíduo de Casca de Ovo em Tijolo Solo-Cimento**. Confict, 2011.
- CHI, Y., LIU, R., LIN, M., & CHI, Y. **Um novo processo para separar as membranas da casca do ovo por meio de evaporação instantânea**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 42, e07522. (2022)
- DE ALMEIDA, A. R. T., & SALIBA, A. F. N. **Hialuronidase na cosmética: o que devemos saber**. *Surgical & Cosmetic Dermatology*, 7(3), 197-203. (2015)
- DE LIMA, LUANA RIBEIRO et al. **Cosméticos orgânicos: uma tendência crescente no mercado**. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 1, p. 4322-4331, (2021)
- DE OLIVEIRA, S. A., TISCHER, C. A., & TISCHER, P. C. F. **Isolamento e Purificação do Ácido Hialurônico (HA) da Crista do Frango**. *Blucher Biochemistry Proceedings*, 1(2), 345-345. (2015)
- H.M. NUSSENZVEIG, **Curso de Física Básica - V. 2** (Edgard Blücher, São Paulo, 1981), 3^a ed
- LAURENT, T. C. **The tree: Hyaluran research in the 20TH century**. *Glycoforum*, (<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA23E.htm> I). (2002)
- MILBRADT, B. G., MÜLLER, A. L. H., SILVA, J. S. D., LUNARDI, J. R., MILANI, L. I. G., FLORES, É. M. D. M., ... & EMANUELLI, T. **Casca de ovo como fonte de cálcio para humanos: composição mineral e análise microbiológica**. *Ciência Rural*, 45, 560-566. (2015)
- OGRODOWSKI, C. S. **Produção de ácido hialurônico por Streptococcus: estudo da fermentação e caracterização do produto**. Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. (2006)
- OLIVEIRA, D. A.; BENELLI, P.; AMANTE, E. R. **Valorização de resíduos sólidos: casca de ovos como matéria-prima no desenvolvimento de novos produtos**. In: 2nd International Workshop

Advances in Cleaner Production. São Paulo. Brasil. (2009)

PAN, NICOLE CALDAS et al. **Ácido hialurônico: características, produção microbiana e aplicações industriais.** BBR-biochemistry and biotechnology reports, v. 2, n. 4, p. 42-58, (2013)

PAVIA, DONALD L. et al. **Introdução à espectroscopia: Tradução da 4ª edição norte-americana.** São Paulo: Cengage Learning, (2010)

RICARDO SANTIN, presidente da ABPA. **Canal rural: cada brasileiro consome 257 ovos por ano.** (2021)

ROSA, CLAUDIA SEVERO DA; et al., **Estudo do ácido hialurônico proveniente da crista de frango: extração, purificação, caracterização e atividade antioxidante.** Santa Catarina (2008)

SANTANA, Ana Raquel Rodrigues. **Atividades biológicas de concentrados peptídicos obtidos através da hidrólise do subproduto membrana da casca do ovo.** 2015.

SOUZA, Maria Laura Reis de et al. **Ácido Hialurônico: uma revisão bibliográfica.** 2023.

WEBER, MARIANA. **Brasil é o quarto maior mercado de beleza e cuidados pessoais do mundo.** 2020. 2020. Disponível em: [https://abihpec.org.br/brasil-e-o-quarto-maior-mercado-de-beleza-e-cuidados-pessoais-do-mundo/%20\(2020](https://abihpec.org.br/brasil-e-o-quarto-maior-mercado-de-beleza-e-cuidados-pessoais-do-mundo/%20(2020). Acesso em: 16 de nov. de 2023