



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica
LITMO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO A PARTIR DA BIOMASSA
RESIDUAL DE PEIXES (CARTILAGENS DE *ELASMOBRANCHII*)**

Mismêble Fernandes dos Santos

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado

Brasília

2017



Universidade de Brasília
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica
LITMO

Mismêble Fernandes dos Santos

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO A PARTIR DA BIOMASSA
RESIDUAL DE PEIXES (CARTILAGENS DE *ELASMOBRANCHII*)**

Dissertação submetida à Banca Examinadora do PPGTQB/IQ-UnB, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestra em Tecnologias Química e Biológica.

Área de Concentração: Tecnologia Química

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado

Brasília

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Mismble Fernandes dos Santos**, matrícula nº **16/0099218**, intitulada ***“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO A PARTIR DA BIOMASSA RESIDUAL DE PEIXES (CARTILAGENS DE ELASMOBRANCHII)”***, apresentada no (a) Auditório Lauro Morhy do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 3 de março de 2017.

Prof. Dr. Angelo Henrique de Lira Machado
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Sarah Silva Brum
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Júlio Lemos de Macedo
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 3 de março de 2017.

Tempo para tudo

¹*Tudo neste mundo tem o seu tempo determinado; há tempo para todo o propósito
debaixo do céu.*

²*Há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de colher;*

³*tempo de matar e tempo de curar; tempo de derrubar e tempo de edificar.*

⁴*Há tempo de ficar triste e tempo de se alegrar; tempo de chorar e tempo de dançar;*

⁵*tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-las; tempo de abraçar e tempo de afastar.*

⁶*Há tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de desperdiçar;*

⁷*tempo de rasgar e tempo de remendar; tempo de estar calado e tempo de falar.*

⁸*Há tempo de amar e tempo de odiar; tempo de guerra e tempo de paz.*

(Eclesiastes 3:1-8)

*Meu amado irmão Maxwell (in memoriam),
o tempo não amenizará a minha saudade de ti.*

Dedico

Aos meus amados pais, Aurelino (in memoriam) e Maria Lúcia, pessoas de grande valor e caráter, responsáveis pela transmissão de princípios que norteiam o meu caminho. Minha mãezinha tão linda, que por meio de esforços honrosos proporcionou o meu ingresso e triunfo no mundo acadêmico;

Ao Gélío, meu amor eterno, cúmplice de minhas escolhas e companheiro de todas as horas, que foi capaz de afugentar o sono avassalador nas madrugadas frias de estudos e de suportar a minha ausência mesmo quando estava tão perto;

Ao meu "Tito", Petit, meu fiel guardião... Amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pelos anjos e pelo infinito azul do Pontal. Por toda a coragem que me destes para alcançar esta vitória.

Aos que compartilham o amor e todos os momentos comigo, minha abençoada família. Te amo...

... minha inspiradora e doce mãe, a quem expresso a minha eterna gratidão por tudo que sou hoje como ser humano e como profissional. Mãezinha, obrigada pelo seu amor, carinho, mimos, comprometimento com a minha trajetória acadêmica e pelas deliciosas comidas enquanto estudava, ...;

... minha alma gêmea, meu querido marido Gélío, pelo companheirismo e pelo seu amor sem medidas diante de tudo. Sem o seu apoio, carinho e paciência não teria conseguido concretizar este sonho;

... meus irmãos, Tânia, Max, Deny e Wellyngton, pela nosso amor e união. Especialmente, à Tânia, pelas orações que tanto me fortaleceram;

... meus sobrinhos lindos de viver, Lipe, Luan, Hugo, Lucas, Thiago e Ana Clara, por tantas alegrias. Em especial, meu querido sobrinho Phillipe Cayan, pelas constantes conversas de incentivo que fizeram com que tudo parecesse tão mais leve;

... minha família de coração, Dorys, Edvaldo, Indiará e Rose, pela generosidade;

... meus presentes de Deus, Petit, Pity e Poan, pela alegria de todas as manhãs e pelos passeios ao cair da tarde... Bom dia "Titos"!

Ao meu orientador, professor Ângelo Henrique de Lira Machado, a quem tenho grande apreço e amizade. Deixo o meu eterno agradecimento pela solicitude, credibilidade e pelo tempo a mim dispensados para a realização deste projeto. E, principalmente, por todo profissionalismo, dedicação e ética que desempenhou sua função, na qual me trouxe ensinamentos e contribuições à minha formação como mestra;

Aos professores da banca examinadora, Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado, Dr.^a Sarah Silva Brum, Dr. Júlio Lemos de Macedo e Dr. Guilherme Dotto Brand pela dedicação e contribuição de cada um neste trabalho. Em especial, à professora Sarah, por ter sido tão solidária comigo naqueles momentos difíceis;

Aos professores do LITMO Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado, Dr. Guilherme Dotto Brand, Dr.^a Maria Lucília dos Santos, Dr.^a Maria Márcia Murta e Dr. Rafael Oliveira Rocha, pela boa convivência, informações científicas, sugestões valiosas e aprendizado constante. Especialmente, ao professor Guilherme, pelo empenho durante a minha solicitação para análises de aminoácidos;

Ao professor Dr. Guilherme Santos da FARMOL-FS e à estudante de mestrado Yasmin, pelo apoio e suporte técnico para a realização da eletroforese, SDS-PAGE e mapeamento de peptídeos;

À professora Dr.^a Maria José Araújo Sales e ao professor Dr. Fabrício Machado Silva, pela grande contribuição para as análises de DSC. Em especial, à professora Mazé por todo suporte e orientações que foram tão fundamentais para a interpretação das curvas de TG e DSC;

Aos professores do IB, Dr.^a Sarah Christina Caldas Oliveira e Dr. Thomas Christopher Rhys Williams, pela gentileza para comigo em relação ao teste de Bradford;

À professora Dr.^a Renata Cardoso S. R. Razuck, pela amizade e pela cortesia de compartilhar comigo os seus conhecimentos e experiências de sala de aula;

Aos professores Dr. Wender Alves da Silva, pelas contribuições e Dr. Carlos Kleber Zago de Andrade, pelas agradáveis aulas de RMN;

Aos professores Dr. Alexandre Fonseca e Dr.^a Fernanda Vasconcelos, pelo uso de seus laboratórios;

Ao técnico Adolfo Carlos do IB, pela grande colaboração durante as etapas de centrifugação e liofilização das amostras;

Aos colegas e amigos do LITMO Carol, Charley, Diana, Francisco, Hélio, João, José, Leandro, Nayara, Paulo, Renato, Saulo, Terezinha, Thiago Rodrigues, Thiago Viana e Vanessa pelos momentos de companheirismo, cooperação, descontração e muito aprendizado. Em especial, à Fernanda pelo apoio nas aulas de nivelamento. Também, à galera do LaQMOS, LaPSCA, LabPol e do AQQUA;

Às amigas Camila Ribeiro, Fernanda Sodré, Lenine, Nádia Viana, Patrícia Marques, Priscila Araújo e Priscila Rios, pelo amparo e pela nossa agradável convivência cotidiana. Especialmente, à Camila, pela companhia, solidariedade e dedicação de boa parte de seu tempo nos momentos de entaves deste trabalho.

Aos companheiros da 2ª turma do curso de PPGTQB, pelos bons momentos de estudo e amizade.

Aos servidores do IQ, equipe da secretaria do PPGTQB, Central Analítica e segurança, pela prestação dos serviços. Especialmente, Leonard Müller pela gentileza e Eduardo pelo suporte com o EDTA;

À Coordenação de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica;

À UnB, IQ, JB e FS pelo oferecimento de toda infraestrutura;

À SEEDF, pela concessão de minha licença com vencimento para estudo de mestrado na UnB;

A todos que contribuíram, mesmo que indiretamente para o desenvolvimento e conclusão deste curso de mestrado.

RESUMO

A biomassa residual de peixes é constituída basicamente por água, carboidratos, lipídeos e proteínas. A massa proteica está em maior quantidade, cuja composição total é representada por cerca de 30% de colágeno. Esta proteína apresenta propriedades físico-químicas e funcionais importantes que podem implicar em seu uso como matéria-prima nos processos de produção de biomateriais com aplicabilidade em diversas áreas. Isto explica o aproveitamento de cartilagens de elasmobrânquios (*Elasmobranchii*) como fonte de obtenção de colágeno. Neste estudo, o Colágeno Ácido Solúvel (ASC) foi isolado a partir das cartilagens de peixes elasmobrânquios oriundas de nadadeiras peitorais de arraia (*Rajidae spp*) e de vértebras da espinha dorsal de Cação-azul (*Prionace glauca*), designadas de amostras A e C, respectivamente. Após liofilização, obteve-se os rendimentos $1,40 \pm 0,10\%$ para A e $0,47 \pm 0,28\%$ para C. As amostras de ASC foram caracterizadas por meio de técnicas de UV-Vis, FTIR, TG/DTG, DSC, SDS-PAGE e Mapeamento peptídico. Ambas as amostras, as quais apresentaram elevados percentuais de proteínas, mostraram semelhanças nas bandas espectrais, nas curvas de decomposição térmica, nas massas moleculares, estimadas em 300 kD, e nas subunidades que eram compostas por cadeias α , β e γ , sugerindo o tipo I de colágeno. A temperatura de desnaturação (Td) $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi obtida para a amostra 2 de Arraia (A2). Estudos comparativos entre os dados obtidos e os apresentados na literatura de referência mostraram-se semelhantes, embora os rendimentos experimentais tenham ficado abaixo do esperado. Contudo, os resultados apontaram para repetitividade do método adotado e para o melhor aproveitamento desse material proteico de modo a minimizar os seus desperdícios e impactos ambientais.

Palavras-chave: Biomassa residual de peixes; *Elasmobranchii*; Colágeno; Biomateriais.

ABSTRACT

The residual biomass of fish is composed basically by water, carbohydrates, lipids and proteins. The protein mass is in higher quantity, whose total composition is represented by about 30% of collagen. This protein has important physicochemical and functional properties, which can result in its use as raw material in biomaterials production processes with applicability in several areas. This explains the use of cartilages of elasmobranchs (*Elasmobranchii*) as a source of collagen production. In this study, the Acid Soluble Collagen (ASC) was isolated from the cartilages of elasmobranchs fishes obtained from pectorals fins of stingray (*Rajidae spp*) and vertebrae of the backbone of Cation-blue (*Prionace glauca*), designated samples A and C, respectively. After lyophilization, the ASC obtained was $1.40 \pm 0.10\%$ yield for A and $0.47 \pm 0.28\%$ yield for C. The samples of ASC were characterized by the following techniques: UV-Vis, FTIR, TG/DTG, DSC, SDS-PAGE and peptide mapping. Both samples, which had higher percentage of proteins, showed similarities in spectral bands, thermal decomposition curves, the molecular weights, estimated as 300 kD, and subunits which were composed of α , β and γ chains, suggesting type I of collagen. The denaturation temperature (Td) 40 °C was obtained for sample 2 of stingray (A2). Comparative studies between the data obtained and those presented in reference literature were similar, despite the fact that the experimental yields were lower than the expected one. On the other hand, the results pointed to the repeatability of the adopted method and the best use of this protein material in order to minimize their waste and environmental impact.

Keywords: Residual biomass of fish; *Elasmobranchii*; Collagen; Biomaterials.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE TABELAS	XIX
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 OBJETIVOS	7
1.1.1 Objetivo Geral	7
1.1.2 Objetivos Específicos	7
1.2 PANORAMA MUNDIAL DO SETOR DE PESCA	8
1.2.1 Produção Global de Pescado	9
1.2.2 Consumo Global de Pescado	12
1.2.3 Produção Global de Elasmobrânquios.....	15
1.2.4 Consumo Global de Elasmobrânquios.....	17
1.2.5 Comércio de Barbatanas	18
1.2.6 Biomassa Residual de Pescado.....	19
1.3 PEIXES CARTILAGINOSOS.....	23
1.3.1 Condrícies (<i>Chondrichthyes</i>)	23
1.4 COLÁGENO	28
1.4.1 Extração e Caracterização do Colágeno de Biomassa Residual de Elasmobrânquios	31
1.4.2 Aplicações Tecnológicas do Colágeno	33

CAPÍTULO 2	35
2 PARTE EXPERIMENTAL	36
2.1 MATERIAIS	38
2.2 MÉTODOS	39
2.2.1 Etapas de Extração do ASC	39
2.2.1.1 Preparação das Cartilagens de Elasmobrânquios.....	40
2.2.1.2 Pré-tratamento das Cartilagens de Elasmobrânquios.....	41
2.2.1.3 Extração de Colágeno Ácido Solúvel (ASC).....	42
2.2.2 Caracterização do ASC	46
2.2.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	46
2.2.2.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	47
2.2.2.3 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)	48
2.2.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	48
2.2.2.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	49
2.2.2.6 Mapeamento de peptídeos	50
CAPÍTULO 3	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E ÁCIDO DAS CARTILAGENS	53
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ASC	61
3.2.1 Técnicas Espectroscópicas	61
3.2.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultra Violeta-Visível (UV-Vis).....	62

3.2.1.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	65
3.2.2 Análises Térmicas	69
3.2.2.1 Termogravimetria (TG)/Termogravimetria Derivada (DTG)	70
3.2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	74
3.2.3 Eletroforese SDS-PAGE	77
3.2.4 Mapeamento de Peptídeos	80
CAPÍTULO 4	82
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
4.1 CONCLUSÕES	83
4.2 PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	91

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

AA	Amostra de arraia
A	Arraia
APS	Persulfato de amônio
ASC	Colágeno ácido solúvel (<i>acid soluble collagen</i>)
ASC-D	Colágeno ácido solúvel (<i>acid soluble collagen</i>) - <i>Dasyatis akajei</i>
ASC-R	Colágeno ácido solúvel (<i>acid soluble collagen</i>) - <i>Raja porosa</i>
ASC-S	Colágeno ácido solúvel (<i>acid soluble collagen</i>) - <i>Sphyrna lewini</i>
ATR	Reflectância total atenuada
β-ME	Beta mercaptoetanol (2-mercaptoetanol)
C	Cação
CBBR	Coomassie brilhante azul (coomassie brilliant blue) R-250
DIPOA	Departamento de inspeção de produtos de origem animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (<i>differential scanning calorimetry</i>)
DTG	Termogravimetria derivada (<i>derived termogravimetry</i>)
EDTA	Ácido etileno diaminotetra-acético
FAO	Organização das nações unidas para agricultura e alimentação (<i>food and agriculture organization of the united nations</i>)
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GAGs	Glicosaminoglicanos
Gly	Glicina

Hyp	Hidroxiprolina
IBAMA	Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis
IN	Instrução normativa
IUCN	União internacional para a conservação da natureza (<i>international union for conservation of nature</i>)
MMA	Ministério do meio ambiente
MPA	Ministério da pesca e agricultura
OECD	Organização para a cooperação e desenvolvimento (<i>organization for economic cooperation and development</i>)
OMS	Organização mundial da saúde
ONU	Organização das nações unidas
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
PSC	Colágeno pepsina solúvel (<i>pepsin soluble collagen</i>)
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIF	Serviço de inspeção federal do ministério da agricultura
Ta	Temperatura da amostra
Tr	Temperatura da referência
Td	Temperatura de desnaturação

TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TG	Termogravimetria
Tmax	Temperatura máxima de transição
Trp	Triptofano
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Tyr	Tirosina
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção e consumo mundial de pescado entre 1950 e 2011.....	8
Figura 2. Ranking mundial dos principais países produtores de pescado em 2011.	10
Figura 3. Percentual da produção mundial da pesca de captura e aquicultura em 2011	11
Figura 4. Consumo per capita e produção brasileira de pescado entre 1996 e 2010.	15
Figura 5. Fluxograma da etapa de transformação industrial de pescado (beneficiamento e processamento) e geração de subprodutos pesqueiros, à esquerda.....	21
Figura 6. Características morfológicas de tubarões (caçães).....	24
Figura 7. Características morfológicas de raias (arraias)	24
Figure 8. Breve classificação taxonômica de alguns <i>Chondrichthyes</i>	26
Figura 9. Tecido conjuntivo subjacente à camada de células epiteliais.....	28
Figura 10. (a) Formação das fibras de colágeno; (b) sequência de aminoácidos em três cadeias polipeptídicas compondo a tripla hélice do colágeno	30
Figura 11. Sequência dos aminoácidos Gly, Pro e Hyp formando um tripeptídeo... 31	
Figura 12. Fluxograma de extração do ASC à partir de cartilagens de arraia e de cação.....	39
Figura 13. Cartilagens de elasmobrânquios: (a) barbatanas de arraia, (b) vértebras da espinha dorsal de cação e (c) vértebras dorsais de cação em cortes de ~1-2 cm.	40
Figura 14. Sistema utilizado nas etapas de pré-tratamento e extração.....	42
Figura 15. (a) ASC precipitado - gel translúcido, antes da centrifugação, (b) centrífuga refrigerada e (c) ASC centrifugado - <i>pellets</i> e sobrenadante acima, e <i>pellets</i> isolados à direita.	44
Figura 16. Esquema representativo do processo de diálise.	45

Figura 17. Liofilizador.	45
Figura 18. ASC liofilizado: Amostra A3.	46
Figura 19. Equipamento de eletroforese.	50
Figura 20. Complexo $[Ca(EDTA)]^{2-}$	55
Figura 21. Espectros UV-Vis das amostras AA, A1, A2 e A3 de ASC.	63
Figura 22. Espectros UV-Vis das amostras C1, C2 e C3 de ASC.	64
Figura 23. Espectros UV-Vis das amostras A3 e C3 de ASC.	64
Figura 24. Espectros FTIR das amostras AA, A1, A2 e A3 de ASC.	67
Figura 25. Espectros FTIR das amostras C1, C2 e C3 de ASC.	68
Figura 26. Espectros FTIR das amostras A3 e C3 de ASC.	68
Figura 27. Curvas TG/DTG da amostra AA de ASC.	70
Figura 28. Curvas TG/DTG da amostra A1 de ASC.	71
Figura 29. Curvas TG/DTG da amostra C1 de ASC.	71
Figura 30. Curva DSC da amostra A2 de ASC apresentando um pico endotérmico na temperatura de desnaturação (T_d) e variação de entalpia (ΔH).	74
Figure 31. Padrão SDS-PAGE das amostras AA-A3 e C1-C3 de ASC.	78
Figure 32. Mapa peptídico das amostras AA-A3 e C1-C3 de ASC.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Utilização da produção pesqueira mundial e nacional entre 2005 e 2012... 9	9
Tabela 2. Consumo mundial das principais proteínas animais em 2009 13	13
Tabela 3. Consumo nacional per capita de pescado por regiões entre 2008 e 2009. 14	14
Tabela 4. Produção mundial de elasmobrânquios da pesca de captura entre 2008 e 2011 16	16
Tabela 5. Reagentes, suas respectivas marcas e graus de pureza..... 38	38
Tabela 6. Rendimento, média e desvio padrão das amostras A e C de ASC. 59	59
Tabela 7. Principais absorções do espectro de FTIR das amostras A e C de ASC, grupos funcionais e modos vibracionais das ligações. 65	65
Tabela 8. Eventos de cada estágio das curvas TG/DTG das amostras AA, A1 e C1 de ASC. 73	73

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A maior porção da biodiversidade disponível na Terra se concentra nas zonas costeiras e oceânicas, as quais têm sido exploradas há milênios pela humanidade, por meio da pesca e da aquicultura, na busca de recursos essenciais à sua subsistência.¹

Diante da real possibilidade de escassez dos recursos pesqueiros devido às capturas em larga escala, torna-se urgente a conservação desses ecossistemas para que a sustentabilidade da pesca e da aquicultura seja assegurada. Hoje, essas atividades exercem um importante papel socioeconômico para diversos países, uma vez que garantem segurança alimentar, emprego e renda para 55 milhões de pessoas no mundo, através do emprego direto.²⁻⁴

Nesse sentido, a Organização das Nações Unidas (ONU), baseando-se no modelo de sociedade sustentável, tem estabelecido ações de integração entre o desenvolvimento socioeconômico e proteção ambiental, cujas diretrizes são, entre outras, reduzir a perda da biodiversidade, restabelecer e manter os estoques naturais de peixes, combater a fome, a desnutrição e pobreza extrema no mundo.^{2,3,5-7}

Para enfrentar tais desafios, vários países vêm implementando políticas públicas, consolidadas nas interfaces social, ambiental e econômica, que têm contribuído para o aquecimento da produção e consumo global de carnes, sobretudo, de pescado. A nível global, o seu consumo per capita aumentou de ~10 kg na década de 60, para 19,2 kg em 2012. No ano de 2010, representou 6,5% da ingestão de todas as proteínas consumidas e 16,7% do total da ingestão de proteínas de origem animal para 2,9 bilhões de pessoas no mundo. Este valor chega a 70% nas zonas urbanas costeiras, onde se concentra mais de 50% da população mundial, e nas zonas insulares.^{2-4,8}

Os benefícios da carne de pescado como alimento estão associados às suas propriedades nutritivas, tais como baixo teor de gorduras saturadas, alto teor de

proteínas, ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3 e 6), micronutrientes – vitaminas (A, D, E, e do complexo B) e minerais (Ca, Fe, I, K, Mg, Na, Zn e outros mais).^{4,8,9}

Mundialmente, o peixe é a proteína animal de maior produção (158 milhões de toneladas em 2012), comercialização (130 milhões de dólares em 2012) e consumo (19 kg per capita em 2012). Isto se deve ao aumento demográfico que resulta em uma demanda progressiva por alimento; aos novos hábitos alimentares da sociedade urbana que busca por uma carne mais magra, nutritiva e facilmente digerível; à boa qualidade e maior disponibilidade dos produtos pesqueiros e seus derivados nos estabelecimentos comerciais devido ao rápido crescimento da aquicultura.^{4,8}

Nas últimas décadas, o aumento da produção pesqueira resultou em uma vasta diversidade de peixes marinhos e dulciaquícolas* nos estabelecimentos comerciais à disposição dos consumidores. O consumo de elasmobrânquios, cação (tubarão) e arraia (raia), por exemplo, ao longo da costa brasileira varia conforme aspectos culturais, sendo a carne de algumas espécies utilizada como base de pratos tradicionais, e outras são consumidas como carne de terceira.^{7,10,11}

Os elasmobrânquios apresentam grande importância econômica no mercado mundial. Nos últimos anos, o comércio nacional e internacional de suas barbatanas (nadadeiras) movimentou bilhões de dólares, sobretudo, pelas exportações aos países asiáticos que, tradicionalmente, as utilizam como iguaria na culinária. A transação bilionária desses subprodutos tem se tornado alvo de muita especulação, e isso tem chamado a atenção dos atravessadores que motivam às pescas direcionadas (espécies-alvo), responsáveis pela sobre-exploração** de algumas espécies desse grupo e pelo desembarque intenso de cações e arraias em todas partes do planeta.^{7,10,11}

* Espécies que vivem em água doce.

** Espécies sobre-explotadas são aquelas cuja condição de captura de uma ou todas as classes de idade em uma população são tão elevadas que reduz a biomassa, o potencial de desova e as capturas no futuro, a níveis inferiores aos de segurança.

Após a retirada de suas porções de interesse econômico, o restante do corpo, de baixo valor comercial, quando não lançados ao mar, são destinados à comercialização em supermercados e feiras para consumo humano.^{7,10,11}

Tais práticas insustentáveis levam algumas espécies ao colapso e põem em risco o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. Essa relação conduz à incerteza de se garantir a segurança alimentar de quase 1 bilhão de pessoas subnutridas e das próximas gerações em todo planeta, essencialmente para uma população estimada para ano de 2050 em 9,6 bilhões de habitantes, dos quais boa parte dependerá dos recursos pesqueiros para a sua sobrevivência. Portanto, tornam-se necessárias as reflexões em torno desse risco para humanidade.¹²

Para que a produção de pescado fosse otimizada de modo a atender a demanda global de consumo, e assim, garantir o suprimento imediato de um alimento proteico e essencial à população humana, a pesca industrial veio a ser incorporada à pesca artesanal. Por conseguinte, o setor pesqueiro se expandiu e se tornou um dos mais dinâmicos, globalizados e competitivos na produção mundial de alimentos. No ano de 2011, a pesca industrial representou 80,0% de todo pescado desembarcado no Rio Grande do Sul, enquanto que a pesca artesanal chegou a um total de 20,0%. Contudo, a industrialização desse setor não tem trazido apenas benefícios para as suas atividades, mas, também, riscos socioambientais pelos subprodutos gerados ao longo de sua cadeia produtiva.^{9,13}

No contexto da globalização, em que as indústrias de diferentes setores se tornam mais competitivas, é necessário que cada uma avalie os impactos ambientais, sociais e econômicos decorrentes de suas atividades produtivas e busque meios para minimizá-los.

Em referência ao setor produtivo pesqueiro, algumas indústrias de processamento têm desenvolvido novas tecnologias na tentativa de resolver tais problemas. Assim, a biomassa residual de pescado tem sido aproveitada como matéria-prima em diferentes linhas de produção, por exemplo, de farinhas, óleos, fertilizantes e outros produtos. No entanto, ainda não é explorada em toda a sua totalidade, logo, o excedente gera dificuldades de estocagem, e a inexistência de um

gerenciamento adequado faz com que o seu destino seja os depósitos a céu aberto, lixões.^{4,9}

A deposição irregular dessa matéria orgânica em grandes toneladas/dia, com alto grau de perecibilidade, causa, gradativamente, problemas de ordem ambiental e socioeconômico devido à enorme produção de chorume, que acaba atraindo vetores, contaminando o solo e lençóis freáticos.⁹

Portanto, no campo da Ciência e Tecnologia, têm surgido alguns avanços em relação ao melhor aproveitamento desses resíduos orgânicos, principalmente, como fonte alternativa para a obtenção de proteínas, lipídeos e polissacarídeos. Dada as suas diversidades estruturais e propriedades funcionais, essas biomoléculas vêm sendo utilizadas como matéria-prima nos processos de produção de biocombustíveis, biomateriais, biopolímeros e outros mais.¹⁴

Dentre as proteínas presentes na biomassa de peixes, o colágeno tem recebido uma significativa importância nos últimos tempos. Por ser muito versátil, torna-se objeto de estudo por parte da comunidade científica e da indústria cujo interesse está em seu uso para a produção de géis, filmes, matrizes, alimentos funcionais, cosméticos, biofármacos e diversos materiais com inúmeras aplicações tecnológicas e comerciais em diversos setores.^{9,14}

O colágeno está presente nos tecidos conjuntivos de todos os animais, podendo ser obtido de subprodutos das indústrias bovina, suína, avícola, pesqueira e outras. Entretanto, em escala industrial, é extraído de resíduos de bois e suínos gerados das etapas de produção de suas carnes, sobretudo, do processamento do couro desses animais. Porém, os subprodutos de peixes (também os de aves) ainda são pouco explorados para tal fim, pois são raros os artigos disponíveis na base de dados da literatura científica que abordam essa questão, apesar de sua vasta produção/dia ao longo da cadeia de pescado e de suas potencialidades bioquímica e tecnológica.¹⁴⁻¹⁶

Considerando-se tal fato, e também a opção dos consumidores pela proteína de peixe em detrimento às outras proteínas animais (muitas vezes associada aos aspectos socioculturais e religiosos), torna-se necessário um melhor aproveitamento da biomassa residual pesqueira como matéria-prima para a obtenção de produtos alternativos com diversas aplicações. Portanto, agregar valor a esses resíduos, 100% natural, renovável, biodegradável e de custo praticamente nulo, pode gerar renda e diminuir os prejuízos ambientais, sociais e econômicos que são decorrentes de seu descarte inadequado.¹⁴⁻¹⁶

Sob essa ótica, o presente trabalho, cujo desdobramento se baseia na sustentabilidade ambiental e socioeconômica, tem como objetivo o isolamento e caracterização de colágeno a partir de resíduos cartilagosos de elasmobrânquios – arraia (*Rajidae spp*) e Cação-azul ou Tubarão-azul (*Prionace glauca*), entretanto, apenas os capturados de modo sustentável e comercializados de forma lícita, sob nº SIF/DIPOA – Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, exercido pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.¹⁷

Ressalta-se que com esta pesquisa, não se pretende colaborar para a sobrepesca de elasmobrânquios, sobretudo, de espécies consideradas sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-exploração em águas brasileiras (Portaria nº 125/2014, IN MMA 52/2005)¹⁸ e internacionais, mas apenas contribuir para a minimização de seus rejeitos no meio ambiente, visto que são bastante demandados mundialmente para consumo humano, e ainda, valorizar as características ímpares de seus tecidos conjuntivos, exclusivamente cartilagosos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem por objetivo geral isolar e caracterizar o Colágeno Ácido Solúvel (ASC) a partir da biomassa residual de peixes elasmobrânquios (*Elasmobranchii*). A saber, das cartilagens das nadadeiras peitorais de arraia (*Rajidae spp*) e das vértebras da espinha dorsal de Cação-azul ou Tubarão-azul (*Prionace glauca*).

1.1.2 Objetivos Específicos

- Isolar o Colágeno Ácido Solúvel (ASC) a partir de resíduos cartilagosos das nadadeiras peitorais de arraia (*Rajidae spp*) e das vértebras da espinha dorsal de Cação-azul ou Tubarão-azul (*Prionace glauca*);
- Preparar as cartilagens para as extrações do ASC;
- Desproteínizar as cartilagens com NaOH durante o pré-tratamento;
- Desmineralizar as cartilagens com EDTA durante o pré-tratamento;
- Extrair o ASC com CH₃CO₂H, depois precipitá-lo com NaCl e isolá-lo por meio de técnicas de purificação;
- Calcular o rendimento das amostras de ASC (liofilizadas);
- Caracterizar o ASC por meio de técnicas usuais em análises bioquímicas, tais como Espectroscopia na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada (TG/DTG); Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC); Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Mapeamento Peptídico.

1.2 PANORAMA MUNDIAL DO SETOR DE PESCA

Neste texto, todos os dados de produção e consumo de pescado foram compilados dos últimos boletins estatísticos da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA).

Como pode ser observado na Figura 1, ao longo das últimas seis décadas, a produção e o consumo mundial de pescado vêm aumentando paralelamente com o crescimento populacional no mundo, que hoje está em 7,2 bilhões de pessoas. O suprimento de pescado proveniente da aquicultura, tanto continental quanto marinha, apresentou um incremento médio anual de 13% para 40% entre 1990 e 2010. Enquanto, o suprimento da pesca de captura (extrativa continental e marinha) sofreu um declínio no final da década de 80 e início da de 90, vide Figura 1, por conta da sobrepesca predatória ocorrida em anos anteriores, que levou os estoques naturais de peixes ao limite. Já entre os anos de 1990 e 2000, houve um leve crescimento e, após esse período, permaneceu no mesmo patamar devido à recuperação de seus estoques, contudo, ainda houve uma pequena variação de 88 milhões de toneladas para 93,5 milhões de toneladas.^{4,6,19}

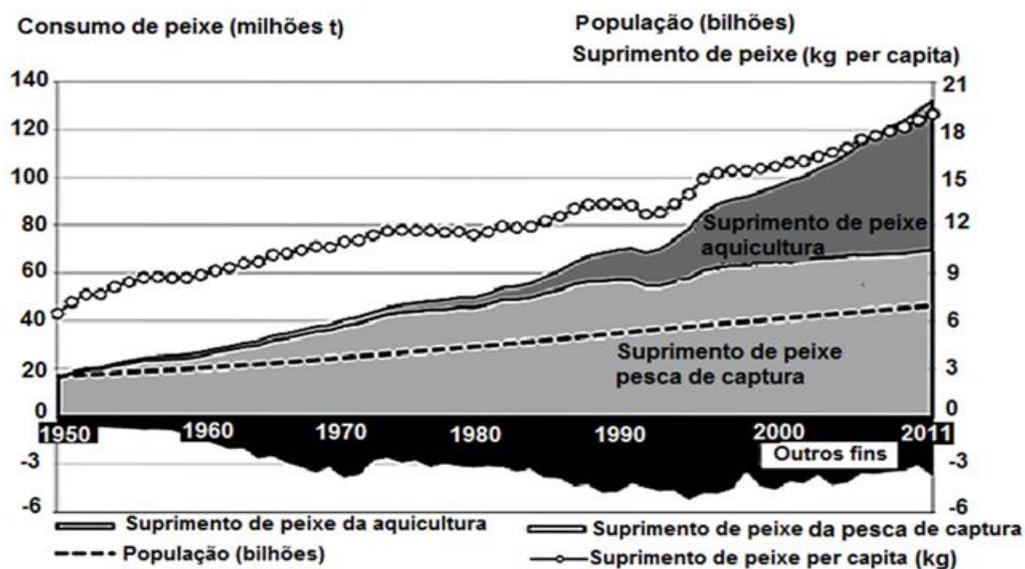


Figura 1. Produção e consumo mundial de pescado entre 1950 e 2011.¹⁹

1.2.1 Produção Global de Pescado

Na Tabela 1, é possível observar que dos 158,0 milhões de toneladas de pescado produzido no mundo em 2012, 136,2 milhões de toneladas foram destinados à alimentação humana. Desses números, obteve-se o consumo per capita mundial de pescado de 19,2 kg/habitante/ano. Os 21,7 milhões de toneladas restantes foram designados para outros fins, tais como tratamento industrial e diversos usos.^{4,19,20}

Tabela 1. Utilização da produção pesqueira mundial e nacional entre 2005 e 2012.^{4,19,20}

Utilização de pescado	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Produção mundial ^a	136,7	137,5	140,6	143,0	145,7	147,9	156,1	158,0
Consumo mundial ^a	109,6	114,5	117,4	120,7	123,8	128,1	132,1	136,2
Consumo mundial ^b	80,2	83,3	83,5	84,4	85,0	86,6	84,7	86,2
Consumo per capita mundial ^c	16,9	17,6	17,8	18,0	18,2	18,6	18,9	19,2
Outros fins ^a	27,1	22,9	23,2	22,2	21,9	19,8	23,8	21,7
Outros fins ^b	19,8	16,7	16,5	15,6	15,0	13,4	15,3	13,8
Produção nacional ^a	1,0	1,0	1,0	1,1	1,2	1,2	1,4	1,5
Produção nacional ^b	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9
Consumo per capita nacional ^c	6,7	7,3	7,7	8,4	9,0	9,8	11,2	9,0

^a Milhões de toneladas; ^b %; ^c Kg/hab/ano

Dentre os dez maiores produtores mundiais de pescado em 2012, sete países são do continente asiático. Só a China, por exemplo, teve uma participação majoritária com 54,3 milhões de toneladas, correspondentes a 15,7 milhões de toneladas (10,1%) de produção extrativa (pesca de captura) e 38,6 milhões de toneladas de produção aquícola. Assim, permanece desde 2002 como maior produtor mundial dessas duas atividades pesqueiras. A Figura 2 representa o ranking mundial da produção de pescado em 2011, a China desponta em 1º lugar com a maior taxa de produção, 54,0 milhões de toneladas, e na sequência seguem a Índia e a Indonésia com 8,8 e 8,4 milhões de toneladas, respectivamente. O Brasil aparece na 19ª posição com 1,4 milhão de toneladas.^{3-5,19}



Figura 2. Ranking mundial dos principais países produtores de pescado em 2011.³⁻⁵

A pesca de captura tende a recuperar as unidades populacionais de peixes e aumentar sua produção em 2% até 2023, isto é, passar das 93 mil toneladas atuais para 95 mil toneladas. Entretanto, devido à sua constância na produção no decorrer dos tempos, houve a expansão crescente da aquicultura no suprimento de peixes para o consumo humano, como ilustrado na Figura 1. Esse fator auxiliou no incremento do consumo anual de pescado por habitante no mundo (consumo per capita mundial, supracitado) e tende a crescer ainda mais, conforme as estimativas da FAO para 2030 em que a produção mundial de espécies aquáticas cultivadas será em torno de 60%. Logo, para suprir a demanda crescente por proteína animal de uma população do mundo que será 8,3 bilhões de pessoas, a aquicultura será um caminho alternativo.^{3,8,21}

Embora o setor aquícola tenha avançado nas últimas décadas, a pesca de captura ainda é o segmento mais importante para o setor pesqueiro no mundo, a qual responde por ~60% da produção global de pescado, ao passo que a aquicultura é responsável pelos 40 % restantes, como pode ser visto na Figura 3.^{4,19,20}

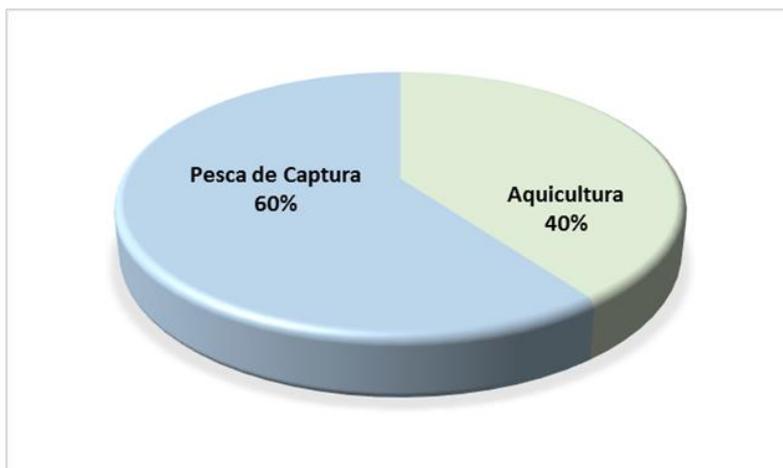


Figura 3. Percentual da produção mundial da pesca de captura e aquicultura em 2011.^{4,19,20}

Em 2011, a produção pesqueira nacional apresentou um bom desempenho nas atividades de cultivo e captura, e assim, teve um incremento de 13,2%. Isto permitiu ao Brasil continuar na mesma posição do ano anterior, 19º produtor mundial de pescado, com 1,4 milhão de toneladas, 0,9% do total produzido no mundo. Esses valores estão representados na Figura 2. A maior parte dessa produção veio de 803,2 mil toneladas da pesca de captura (extrativa continental, 249,5 mil toneladas, 17,4%, e, principalmente, extrativa marinha, 553,7 mil toneladas, 38,7%). A parcela da aquicultura foi de 629,3 mil toneladas (continental, 544,5 mil toneladas, 38%, e marinha, 84,8 mil toneladas, ~6%).^{4,8,20}

Esses valores provêm dos maiores produtores da pesca extrativa marinha, Santa Catarina e Pará, com respectivamente 121,9 mil toneladas e 87,5 mil toneladas. Também, dos maiores produtores da pesca extrativa continental, Amazonas e Pará, com 63,7 mil toneladas e 55,4 mil toneladas, respectivamente. Já em 2013, a produção brasileira chegou a 2,5 milhões de toneladas, 1 milhão a mais em relação ao ano de 2012.^{4,6,20}

As expectativas para o futuro do Brasil são boas. Segundo a FAO, o nosso país pode se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado em 2030, com uma produção estimada em 20 milhões de toneladas. Essa estimativa poderá vir a ser alcançada, pelo fato de o setor pesqueiro nacional ser muito promissor e ter alto potencial para isso. Pois, o território brasileiro possui uma extensa faixa litorânea de

8,5 mil quilômetros e contém a maior reserva de água doce do mundo, acima de 12% (5,5 milhões de hectares) e grande biodiversidade nas águas marinhas e continentais, cerca de 3 mil espécies nativas. E ainda, apresenta a maior diversidade de peixes do planeta, localizada na Região da Amazônia.^{3,4,6,8}

1.2.2 Consumo Global de Pescado

Em 2011, do total de 156,1 milhões de toneladas produzidas mundialmente, foram utilizadas 132,3 milhões de toneladas para alimentação humana, correspondentes a 84,7% (39,3% na forma de pescado fresco, 24,3% congelado e 21,1% curado e em conserva), vide Tabela 1. Lembrando que a parte de 23,8 milhões de toneladas, equivalentes a 15,3%, teve outros destinos. Na Tabela 1, observa-se que a média mundial de consumo per capita foi 18,9 kg/habitante/ano, isto é, bem acima do consumo per capita mundial de pescado determinado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), cujo valor é de 12 kg/habitante/ano, nível mínimo para a segurança alimentar da população mundial. Em 2010, a ordem decrescente de consumo per capita por continentes foi: Oceania, Europa, América do Norte, Ásia, África e América Latina, com respectivamente, 25,4; 22,0; 21,8; 21,6; 9,7 e 9,7 kg/habitante/ano.^{4,6,8}

Em 2009, na classificação global das principais carnes como fonte de consumo de proteína animal, a carne de pescado ficou em primeiro lugar, vide Tabela 2, com 123,8 milhões de toneladas e o consumo per capita de 18,2 kg/habitante/ano, como visto na Tabela 1, enquanto, o consumo das carnes avícola e bovina seguiram em terceiro e quarto lugares na preferência internacional, com respectivamente, 71,8 milhões de toneladas, 10,5 kg per capita e 56,1 milhões de toneladas, 10 kg per capita. Boa parte desse quadro se volta à preservação das tradições milenares de algumas regiões do mundo, como na Ásia e no Mediterrâneo, onde as pessoas possuem uma dieta baseada na ingestão de peixes como fonte natural de proteína animal. Esse fato tem contribuído, e muito, para os valores de consumo per capita de pescado serem

bem acima do estabelecido pela OMS. Por exemplo, a China e o Japão, possuem os maiores valores mundiais, 27 e 61 kg/habitante/ano, respectivamente.^{4,6,8}

Nos anos de 2012 e 2013, os consumos chegaram a 19,2 kg per capita/ ano. Segundo as estimativas da FAO e OECD, *Organization for Economic Cooperation and Development*, para o ano de 2023, o consumo per capita será de 20,9 kg/habitante/ano.^{3,4,20,21}

Tabela 2. Consumo mundial das principais proteínas animais em 2009.^{4,20,22}

Proteína animal	produção (milhões t)	consumo (milhões t)	consumo per capita (kg/hab/ano)
Pescados	145,7	123,8	18,2
Suínos	100,3	100,2	16,0
Aves	72,2	71,8	10,5
Bovinos	57,0	56,1	10,0
Caprinos e ovinos	13,2	13,1	1,9

No Brasil, a ingestão de proteína animal provém basicamente das carnes de aves e de bovinos. Em 2009, foram consumidos 8,0 milhões de toneladas de carne de aves, 40,8 kg/habitante/ano, e 7,4 milhões de toneladas de carne bovina, 32 kg/habitante/ano. Talvez, o maior consumo dessas carnes se deve ao fato de o hábito alimentar dos brasileiros está arreigado às questões culturais e pela boa atuação brasileira nas produções nacionais de carnes bovina e de aves, já que o Brasil é o 3º maior produtor mundial do setor avícola e o 2º maior produtor mundial de carne bovina.²²

Contudo, tal hábito não pode ser generalizado para todas as regiões brasileiras. A região Norte, por exemplo, os gastos com peixes frescos e o consumo per capita de sua população são os maiores do País. Em 2008, os seus estados Amazonas, Pará e Amapá tiveram os consumos per capita 30, 18 e 15 kg/habitante/ano, respectivamente. Entre 2008 e 2009, o maior consumo de pescado foi na região Norte com 38,1 kg/habitante/ano, enquanto que na região Sul foi bem menor, 3,1 kg/habitante/ano, conforme Tabela 3. O consumo de pescado pode estar relacionado

ao poder de compra das pessoas, à boa oferta de diferentes carnes (tanto os preços quanto à qualidade) e às preferências regionais.^{6,19,22}

Tabela 3. Consumo nacional per capita de pescado por regiões entre 2008 e 2009.^{6,22}

Consumo per capita de pescado (g/hab/dia) por regiões					
	Norte	Nordeste	Sudeste	Centro Oeste	Sul
Peixe fresco	95,0	35,1	11,4	8,5	6,8
Peixe em conserva	0,6	0,6	0,4	0,2	0,1
Peixe salgados	6,8	3,8	2,6	0,6	0,9
Outros pescados	2,1	0,6	0,5	0,0	0,8
Total do consumo ^a	104,5	40,1	14,9	9,3	8,6
Total do consumo ^b	38,1	14,6	5,4	3,4	3,1
^a per capita (g/hab/dia) ^b per capita (kg/hab/ano)					

As estatísticas da FAO e MPA demonstram que o perfil de consumo brasileiro por carnes vermelhas e aves vem sendo substituído a cada ano e de modo crescente, por uma carne mais leve e de fácil digestão como a de pescado. Esse fato pode ser elucidado pelo consumo per capita nacional de 11,2 kg/habitante/ano, em 2011, Tabela 1. Inclusive, quase alcançou a meta de 12 kg/habitante/ano que foi estimada pela FAO para o referido ano.^{6,8}

Entre 2000 e 2009, o consumo per capita interno de pescado cresceu 30% contra 10% de crescimento da carne bovina. Entre 2004 e 2010, como ilustra a Figura 4, o consumo per capita de pescado aumentou paralelamente ao crescimento de sua produção nacional, de 6,7 para 9,8 kg/habitante/ano. Isto é, um incremento de aproximadamente 8% ao ano.^{6,8}

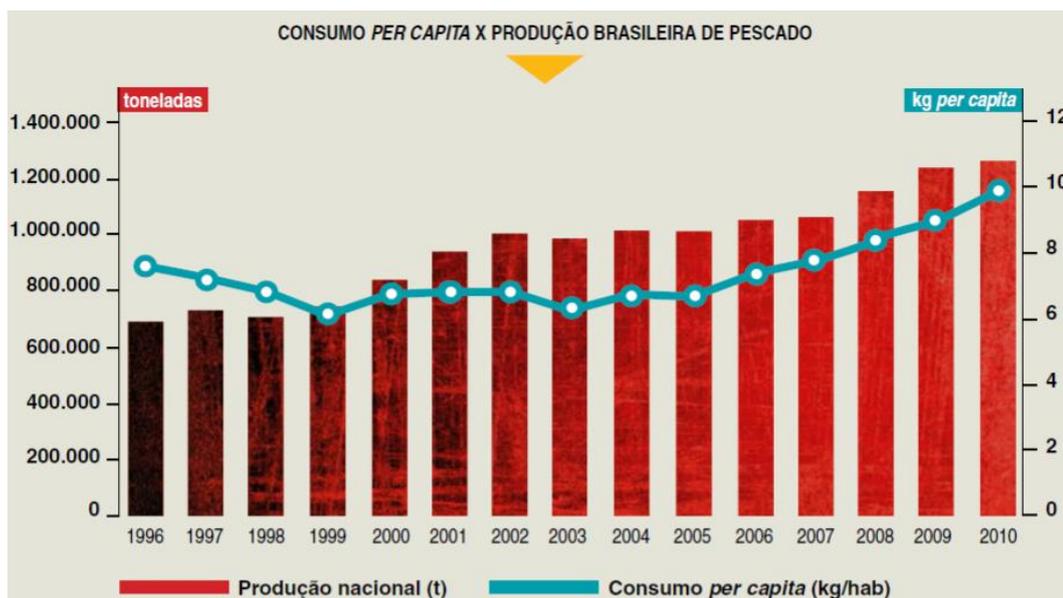


Figura 4. Consumo per capita e produção brasileira de pescado entre 1996 e 2010.⁸

Para suprir essa demanda interna, o Brasil precisou aumentar em 37% as suas importações de pescado provenientes de países asiáticos como China e Vietnã. As estimativas da FAO e OECD apontam um crescimento de mais de 45% no consumo per capita brasileiro até o ano de 2023, chegando 15,3 kg/habitante/ano. Essa projeção ocorre, principalmente, por causa da expansão da aquicultura; divulgação científica das análises nutricionais da composição do pescado, que fundamenta a sua importância como base proteica na alimentação humana; por fim, das iniciativas governamentais e não governamentais que impulsionam a população brasileira (200,4 milhões de pessoas) para o consumo de um alimento mais saudável.^{6,8,20}

1.2.3 Produção Global de Elasmobrânquios

As capturas de elasmobrânquios têm crescido nos últimos anos. Entre 2008 e 2011, a produção nacional da pesca de captura desses peixes variou de 18,6 a 18,7 mil toneladas, chegando a um total de 78,3 mil toneladas nesses quatro anos. Esse valor procedeu apenas da pesca extrativa marinha que ocorreu em toda a costa

brasileira, tanto de forma artesanal quanto industrial, cujas capturas totais de cada grupo foram 28,2 mil toneladas de arraia, 43,6 mil toneladas de cação e 6,5 mil toneladas de Cação-azul (*Prionace glauca*), como mostra a Tabela 4. A pesca extrativa continental de arraia totalizou 3,1 mil toneladas nos referidos anos. Atualmente, as capturas ocorridas no território marítimo brasileiro passam de 15,0 mil toneladas/ano de cação e arraia, cerca de mais de 4% do total da produção anual da pesca extrativa marinha no mundo.^{6,20}

Nos referidos anos, a produção mundial de pesca extrativa de elasmobrânquios variou de 734,3 a 773,4 mil toneladas, como ilustra a Tabela 4, totalizando ~3 milhões de toneladas.¹⁹ Nos últimos 30 anos, a grande demanda asiática por brânquias (guelras) e barbatanas (nadadeiras) implicou em um aumento expressivo na produção mundial de pesca de captura desses peixes.^{7,10,11,20}

Tabela 4. Produção mundial de elasmobrânquios da pesca de captura entre 2008 e 2011.^{6,19,20}

Produção da pesca de captura de elasmobrânquios (mil t)					
	Grupo zoo	2008	2009	2010	2011
	Arraia	6,7	7,4	7,0	7,1
Nacional	Cação	10,0	12,0	11,9	9,7
	Cação-azul	1,9	1,2	1,5	1,9
Mundial	Cação e arraia	734,3	752,2	733,3	773,4

Aliadas às essas capturas direcionadas, há também diversas capturas incidentais de cação e arraia como fauna acompanhante de outras espécies de maior valor comercial. Tais atividades promovem maiores rejeições desses peixes, tanto a nível mundial quanto nacional. No Brasil, foram descartados 32% da captura total de elasmobrânquios nos anos 1990.^{7,11}

1.2.4 Consumo Global de Elasmobrânquios

Tradicionalmente, as brânquias e barbatanas de elasmobrânquios são muito procuradas para fins medicinais e gastronômicos na Ásia. Nesse continente, a sopa gelatinosa de barbatanas de tubarão é bastante popular por ser considerada afrodisíaca e símbolo de prosperidade. Em alguns eventos da elite social asiática, esse peixe é servido em banquetes como forma de ostentação e poder.^{7,10,11}

A China é o maior consumidor mundial desses subprodutos. Em 2008, pagou ao Brasil 2,3 milhões de dólares pela importação de barbatanas de tubarão. O mercado nacional não só exporta para a China, Japão e Taiwan, como também, importa dos mesmos, toneladas de Tubarões-azuis congelados para atender a demanda interna. Em 2010 e 2011, foram 13,6 mil toneladas e 19,2 mil toneladas, respectivamente.^{7,10,11}

No Brasil, nos anos de 2008 e 2009, o consumo per capita anual de cação fresco por região foi maior no Norte, Sudeste e Nordeste com 93 g, 44 g e 27 g, respectivamente, e menores no Sul, 25 g e Centro Oeste, 9 g. Geralmente, os elasmobrânquios são comercializados frescos, defumados, salgados, congelados, em postas ou inteiros. Para a sua comercialização legal em território nacional, é preciso ter o registro no Ministério da Agricultura sob o número do Serviço de Inspeção Federal (SIF), fornecido pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA).^{17,19,20}

O cação é vendido em feiras e comércios locais. A arraia era desprezada para fins comerciais devido ao seu baixo valor comercial diretamente para consumo, apesar de possuir carne macia e sabor marcante. Entretanto, está cada vez mais presente na culinária de apreciadores e curiosos de muitas localidades, pois alguns restaurantes vêm incorporando em seus cardápios, pratos com toques especiais, que incluem diferentes combinações de ingredientes regionais com esse peixe.^{10,11}

1.2.5 Comércio de Barbatanas

Em 2011, as arraias e cações foram negociados por US\$ 780,0/tonelada do total da produção mundial, 766,0 mil toneladas, contabilizando assim US\$ 598,0 milhões. No mercado externo, o quilo da carne de cação é vendido por apenas US\$ 10,0, ao passo que a mesma quantidade de suas valiosíssimas barbatanas é negociada por quase 50 vezes mais que esse valor.^{10,11,19}

O bilionário comércio internacional de barbatanas de cação e arraia influencia a pesca ilegal de várias espécies de elasmobrânquios, geralmente associada à prática de *finning* (proibida por lei: Instrução Normativa Interministerial MPA/MMA nº 14, DOU 28/11/2012).²³ Esta ação predatória consiste no descarte desses animais mutilados, ainda vivos, das embarcações, após a retirada de suas barbatanas para fins comerciais. O restante de seu corpo, 95%, não é de interesse econômico.^{7,10,11,20,24}

A sobrepesca de elasmobrânquios leva ao decréscimo populacional de algumas de suas espécies, por conseguinte, pode haver o risco de ficarem ameaçadas de extinção. No Brasil, estão ameaçadas o Cação-anjo (*Squatina oculata*), Raia-viola (*Rhinobatos horkelii*), Cação-bico-doce (*Galeorhinus galeus*) e o Tubarão-peixe-serra (*Pristis pectinata*).^{7,10,11}

Embora essas espécies, assim como algumas outras, estejam protegidas por normas ambientais, as medidas de gestão para as suas capturas ficam difíceis devido à falta de registro e de precisão nas informações científicas das populações de elasmobrânquios. Isto ocorre quando um determinado animal é registrado pelo seu nome popular ou gênero, ao invés de ser pelo seu nome científico.^{7,24,25} Logo, os dados estatísticos de pesca tornam-se imprecisos, já que o gênero pode conter uma ou centena de espécies, e assim, levar às falhas no monitoramento das populações de tubarão e arraia. Por exemplo, em cada país, os nomes populares acabam designando diferentes nomes (sinônimos) à mesma espécie, inclusive, vários sinônimos, em dadas regiões de um mesmo país. Outra situação comum, é o mesmo nome para diferentes espécies (homônimos).^{7,24,25}

A diversidade biológica, a complexidade dos nomes científicos e as divergências nas regras de nomenclatura não contribuem para um controle mais eficiente da pesca e da comercialização desses peixes. Diante desses fatores e das semelhanças na textura e no sabor das carnes de algumas espécies, a Raia-viola (nome comum do gênero *Rhinobatos*, mais de 45 espécies), por exemplo, é vendida livremente no mercado de peixes no interior paulista em pequenas postas como cação.^{7,10,11}

Em busca de caminhos alternativos que possam reduzir alguns desses problemas, um grupo de pesquisadores recorreu à Biotecnologia, especificamente, à Genética Molecular, para fazer a comparação de sequenciamento de DNA coletado de tecidos de tubarões e arraias, que estão sendo comercializados, com o DNA disponível no banco de dados dos pesquisadores do material biológico das espécies de elasmobrânquios viventes na costa brasileira.^{10,11,25}

A conservação desses predadores é fundamental para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos e para a sustentabilidade da pesca. Nessa perspectiva, há 20 anos, a FAO elaborou o Código de Conduta de Pesca Responsável,²⁶ no qual se estabelece princípios e métodos para a pesca e a aquicultura, baseados em planos de ações e estratégias que promovam o aprimoramento na precisão das informações científicas.^{7,10,11,25}

1.2.6 Biomassa Residual de Pescado

No sentido mais amplo, a biomassa é definida como qualquer tipo de matéria orgânica derivada de fontes animais ou vegetais, ou de seus processos de transformações naturais ou artificiais. Por ter origem direta ou indireta do processo de fotossíntese é tida como um recurso renovável.²⁷

A biomassa residual de peixes, como toda biomassa animal, é composta por diferentes grupos de biomoléculas. Os ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos e proteínas são os seus constituintes principais, responsáveis por suas propriedades

físico-químicas e características próprias que lhe conferem aplicações em diversas áreas.⁹⁻¹⁶

Da totalidade da biomassa inicial pesqueira, boa parcela não é utilizada diretamente para consumo humano, já que a mesma é destinada para outros fins, como por exemplo, para a alimentação de espécies aquáticas cultivadas. Além, de perdas ao longo da cadeia produtiva pesqueira.^{9,20,28}

A cadeia produtiva de pescado se divide basicamente nas etapas de produção (captura), transformação e comercialização. A etapa de transformação consiste no processo de beneficiamento de pescado, que visa manter a qualidade do produto até consumidor final, e resume-se em: seleção, higienização e conservação (congelamento, caso não seja processado de imediato), e ainda, processamento. Ressalta-se que, o pescado começa a ser beneficiado de modo artesanal dentro das embarcações, onde começa a ser eviscerado e acondicionado em baixas temperaturas.^{9,19,20}

O pescado pode ser comercializado *in natura* ou industrializado. Após o beneficiamento, o produto é submetido ao processamento industrial, podendo ser obtido inteiro, filetado, laminado, enlatado, em postas e eviscerado com cabeça, tanto na forma fresca, congelada ou defumada.^{9,19,20} No decorrer desses processos, vide Figura 5, são descartadas várias partes, tais como barbatanas, brânquias, cabeças, esqueletos dorsais, peles, carnes e vísceras, consideradas subprodutos pesqueiros. Entretanto, essa biomassa residual vem sendo empregada como matéria-prima na obtenção de óleos, carne moída para hambúrguer, patê, farinha de silagem e farinha como base proteica nas rações para peixes, aves, porcos, gados, cães e gatos.^{9,20,28}

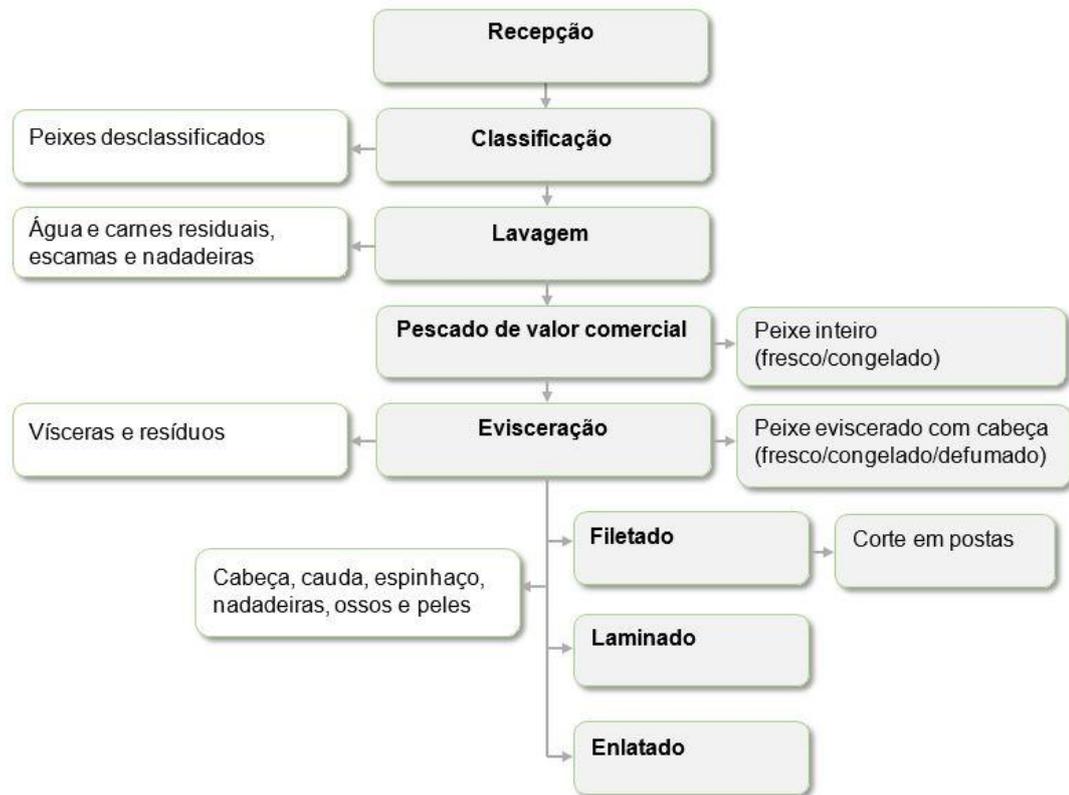


Figura 5. Fluxograma da etapa de transformação industrial de pescado (beneficiamento e processamento) e geração de subprodutos pesqueiros, à esquerda.⁹

Todas as etapas da cadeia produtiva de pescado envolvem a geração e o descarte de subprodutos pesqueiros. No caso da etapa de processamento industrial, dependendo da espécie e da técnica utilizada, a soma da biomassa residual pesqueira passa de 50% do peso total do pescado.⁹ A industrialização da sardinha-verdadeira, eviscerada e espalmada, gera em torno de 35 e 48% de resíduos do total de 54 mil toneladas de sua produção em 2006. O processamento para enlatar o atum produz ~60%.²⁸ Os rejeitos das carpas, por exemplo, podem chegar a ~60% da matéria-prima, e apenas as cabeças somam ~22%. No cenário mundial, só a China produz cerca de 70% da biomassa inicial.^{9,19,20}

O subaproveitamento dessa matéria orgânica e a sua deposição em aterros sanitários implicam em impactos socioambientais e econômicos. Os tecidos de peixes possuem alta pericividade, por isto, entram em processo natural de decomposição acelerada produzindo o chorume em excesso, responsável pela atração de vetores

que ameaçam a saúde populacional e pela contaminação das águas subterrâneas que comprometem o equilíbrio do meio ambiente.^{4,9,20}

Na contramão dessa problemática, está o foco tecnológico nas propriedades bioquímicas dessa biomassa residual pesqueira, com o intuito de viabilizar o seu aproveitamento como matéria-prima para a produção de biocombustíveis, biofármacos, biopolímeros e outros tantos produtos em diferentes áreas.⁹

1.3 PEIXES CARTILAGINOSOS

1.3.1 Condrícties (*Chondrichthyes*)

A classe *Chondrichthyes* (grego: *chondros*, cartilagem; *ichthys*, peixe) compreende as espécies de peixes vertebrados, cujo esqueleto de sustentação é exclusivamente cartilaginoso, sem ossos verdadeiros, e se divide em duas subclasses: *Elasmobranchii*, que inclui as arraias (raias) e cações (tubarões); e *Holocephali*, as quimeras (Peixes-rato ou Peixes-bruxa).^{7,25,29}

Existem cerca de 1000 espécies de peixes cartilagosos (547 de arraias, 405 de cações e 34 de quimeras). A maior parte dessa classe habita oceanos e mares do mundo inteiro, nas zonas abissais, costeiras, demersais, estuarinas e pelágicas. Porém, só algumas espécies de arraias habitam zonas dulciaquícola. Com exceção das quimeras, os cações e arraias são dotados de fendas branquiais respiratórias, por isso, pertencem à subclasse *Elasmobranchii*, ou elasmobrânquios.^{7,25}

A estrutura vertebral cartilaginosa dos condrícties é formada por um tipo especializado de tecido conjuntivo, a cartilagem, que possui tais características: natureza hialina, a mesma encontrada nos vertebrados na forma embrionária; leve e flexível; aspecto esbranquiçado, homogêneo e translúcido; desprovida de tecidos sanguíneo e nervoso; hidrofóbica; e, podendo estar fracamente calcificada nas vértebras da espinha dorsal, nas barbatanas (nadadeiras) e dentes pela presença depósitos de sais de cálcio, mas, não levam à formação de ossos.²⁵

As principais características morfológicas desses peixes são vértebras completas e segmentadas; pares de nadadeiras peitorais, pélvicas e dorsais, uma nadadeira anal (alguns tubarões) e uma caudal que dá equilíbrio à natação; mandíbulas móveis compostas de dentes esmaltados articuladas com o crânio; escamas placóides sobre a pele rígida; órgãos e ductos reprodutores pares; fecundação interna; ovíparos, vivíparos ou ovovivíparos; não possuem bexiga

natatória; brânquias respiratórias.^{24,25} Algumas dessas características estão ilustradas nas Figuras 6 e 7.

Morfologia de tubarões

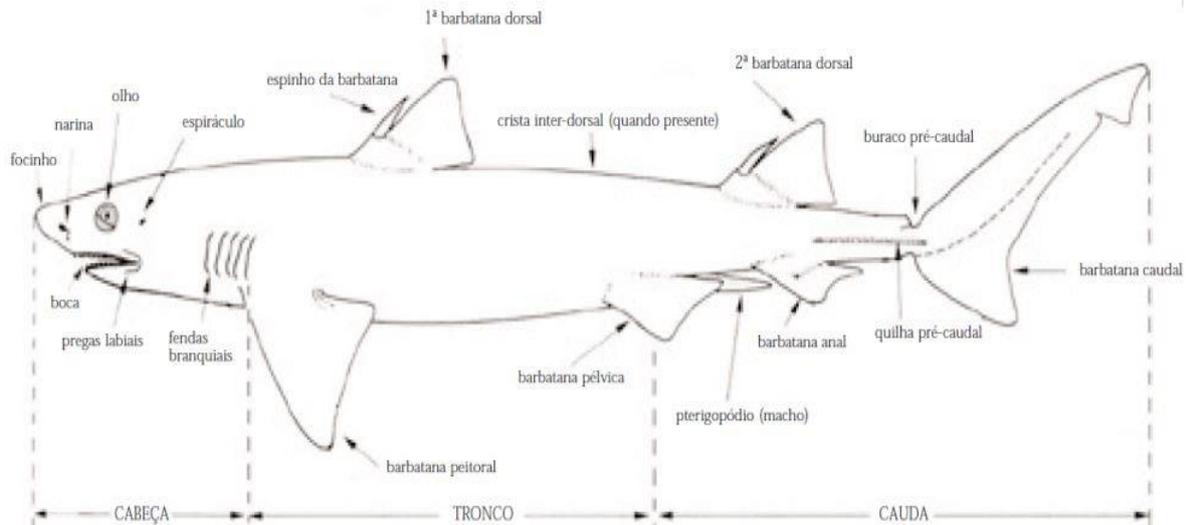


Figura 6. Características morfológicas de tubarões (cações).²⁴

Morfologia de Raias

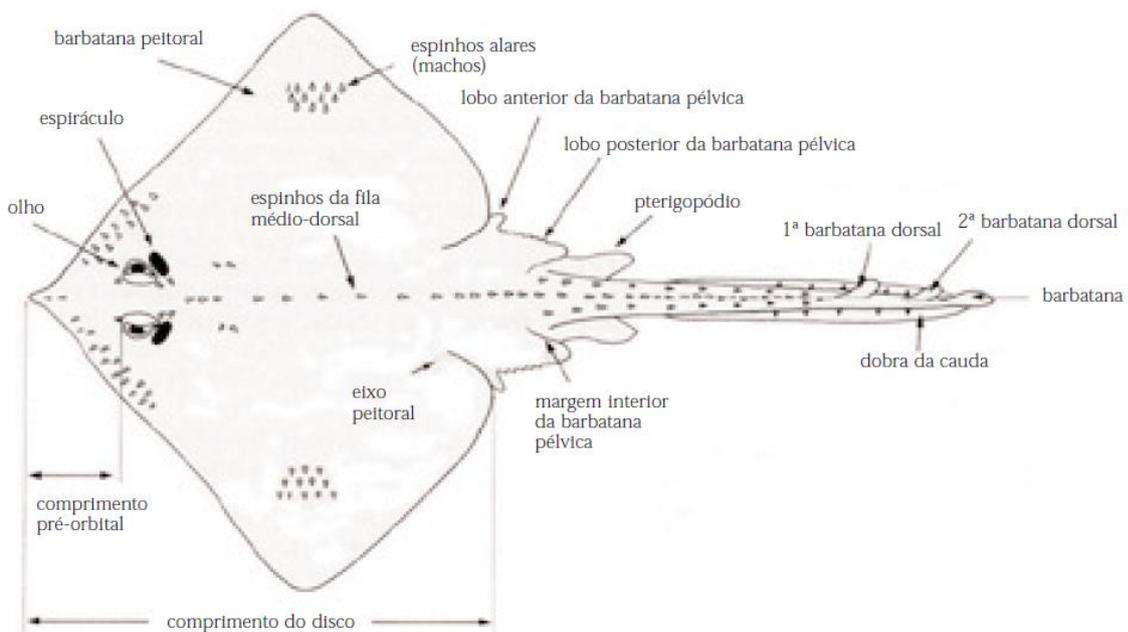


Figura 7. Características morfológicas de raias (arraias).²⁴

Elasmobranchii (grego: *elasma*, placa; *ichthys*, brânquias) refere-se à subclasse de peixes cartilagosos que possuem fendas branquiais. São considerados predadores por ocuparem o topo da cadeia alimentar em diferentes ambientes aquáticos, no entanto, isso é essencial para a manutenção dos ecossistemas aquáticos. Nesse sentido, as medidas de proteção para os elasmobrânquios se tornam necessárias para frear as capturas em larga escala.^{7,25}

Do ponto de vista evolutivo de mais de 400 milhões de anos, os caçõs (tubarões) e arraias (raias) pertencem à mesma subclasse por apresentarem estruturas físicas semelhantes, por exemplo, brânquias respiratórias aderidas às paredes de cinco a sete pares de fendas branquiais independentes. Nos caçõs, essas fendas estão localizadas na frente das nadadeiras peitorais e nas arraias, se encontram na face abdominal por baixo da cabeça, como ilustradas nas Figuras 6 e 7. Nas quimeras, diferentemente, as brânquias ficam presas a um par de fendas, opérculo. Esses peixes pertencem à subclasse *Holocephali* (grego: *holo*, todo; *cephalo*, cabeça), cabeça e maxilar fundidos.²⁵

Os nomes comuns dos peixes podem variar conforme a região e o país. Por isso, a importância da hierarquia taxonômica (do grego: *taxis*, disposição; *nomos*, lei), que configura a classificação científica baseada nas características peculiares e inerentes de cada grupo.²⁵ Tal classificação representa a filogenia – ciência que estuda a história evolutiva entre grupos – com o propósito de mostrar o parentesco entre os organismos. A divisão hierárquica consiste fundamentalmente em reino, filo, classe, subclasse, ordem, família, gênero e espécie. A Figura 8 apresenta uma breve classificação taxonômica de alguns grupos de condricies.^{24,25}

Classe: <i>Chondrichthyes</i> (Tubarões, raias e quimeras)	
Subclasse: <i>Elasmobranchii</i>	
Superordem: <i>Euselachii</i>	
<i>Bathoidea</i> (Raias)	<i>Selachimorpha</i> (Tubarões)
Ordem	Ordem
<i>Rajiformes</i>	<i>Carcharhiniformes</i>
Família	Família
<i>Rajidae</i>	<i>Carcharhinidae</i>
Gênero	Gênero
<i>Raja</i>	<i>Carcharodon</i>
Espécie	Espécie
<i>Okamejei kenojei</i>	<i>Prionace glauca</i>

Figure 8. Breve classificação taxonômica de alguns *Chondrichthyes*.^{24,25}

O Tubarão-azul (*Prionace glauca*; ordem *Carcharhiniformes*, compreendida em 12 gêneros e 59 espécies) é conhecido popularmente como Cação-azul ou Tintureira. Este peixe está entre as espécies de maior distribuição global, habitando em águas frias, tropicais e temperadas de zonas profundas dos oceanos, pelágicas (alto mar) e litorâneas costeiras de toda parte do mundo, com temperaturas entre 7 °C e 25 °C. No Brasil, é o tubarão mais amplamente distribuído nas águas oceânicas das regiões nordeste, sudeste e sul. A dimensão dessa espécie pode chegar a ~4 m de comprimento, sua reprodução se dá por fecundação interna e os embriões se desenvolvem dentro do corpo da fêmea, por isso, classifica-se como vivípara, com 4 até 135 juvenis/ninhada.^{7,25,30}

Por ter um potencial de recuperação acima da média, embora seja uma espécie muito procurada devido à textura e do tamanho de suas barbatanas, é considerada de alta abundância. Em razão disso, o seu estado de conservação é classificado como o de menor risco de extinção, quase ameaçada na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN).³¹ Contudo, essa espécie é considerada sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-explotação em

águas jurisdicionais brasileiras, segundo a Instrução Normativa e a Portaria do Ministério do Meio Ambiente (IN MMA 05/2004; Portaria nº 125/2014).¹⁸

O *Prionace glauca* é capturado no Brasil pela pesca industrial e artesanal. O principal interesse está em suas barbatanas, entretanto, sua carne e couro também são muito utilizados. Atualmente, representa ~60% da composição total desembarcada no Nordeste pelas pescas oceânicas de atuns e afins; no Sul e Sudeste, 50% do volume desembarcado nos portos. O volume estimado da biomassa seca (barbatanas) corresponde de 1,0 a 2,0% do volume da biomassa viva para essa espécie. Entretanto, o volume exportado de barbatanas difere do volume de capturas registradas, o que implica em dizer que existe uma enorme biomassa de tubarões descartada sem registro.⁷ Por isso, como forma de minimizar essa problemática, a Portaria nº 121 (24/8/1998)³² que proíbe o desembarque de nadadeiras sem as respectivas carcaças foi aprovada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

A arraia *Rajidae spp* possui gênero taxonomicamente indefinido, por isso recebe essa classificação genérica com três letras. É representante costeira da família *Rajidae* (ordem *Rajiformes*, representada por 10 famílias) que compreende 18 gêneros e 180 espécies. Esse elasmobrânquio, de reprodução ovípara – ovos encapsulados em invólucros – ocorre na costa brasileira, onde já foram identificadas 11 gêneros e 26 espécies, e em todos os oceanos, a partir do Ártico às águas antárticas e regiões costeiras para abissais, sendo raro em águas rasas tropicais ou perto de recifes de coral; algumas espécies entram em águas salobras. As suas barbatanas são utilizadas para consumo.^{7,25,33}

1.4 COLÁGENO

O tecido conjuntivo ou conectivo, representado na Figura 9, é constituído por células esparsas, denominadas fibroblastos, e por um gel extracelular altamente hidratado que as circundam. Esse gel, intitulado matriz extracelular, é composto por uma complexa rede de macromoléculas que são secretadas, principalmente, pelos fibroblastos. As substâncias fundamentais são as proteínas fibrosas, colágeno e elastina; polissacarídeos, glicosaminoglicanos (GAGs), e glicoproteínas, tais como os proteoglicanos, laminina e fibronectina.^{29,34-36}

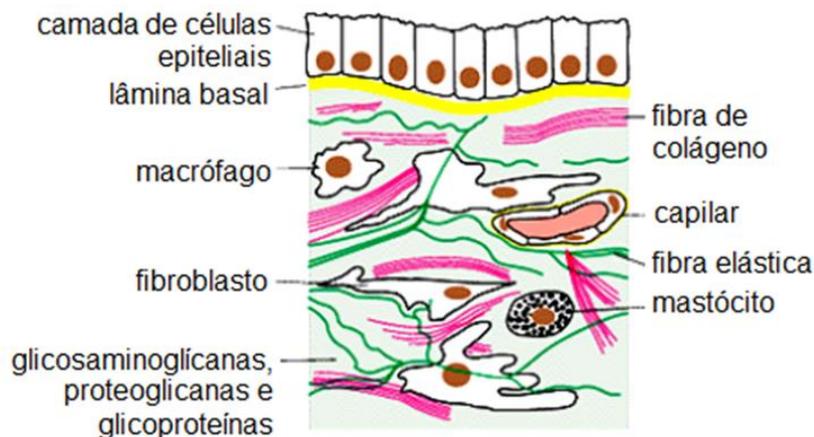


Figura 9. Tecido conjuntivo subjacente à camada de células epiteliais.³⁴

A matriz extracelular tem várias funções, dentre as quais, absorver grande parte das forças de compressão que o tecido está sujeito; permitir a rápida difusão de diferentes substâncias entre as células do tecido e o sangue; ajudar as células e tecidos a permanecerem unidos; viabilizar um meio mais adequado para que as células migratórias se desenvolvam, interajam e proliferem ordenadamente; e por fim, dar estruturação e resistência elástica ao tecido por meio das fibras colágenas e elásticas, respectivamente.³⁴

Em tecidos especializados, como cartilagem e osso, as células fibroblastos apresentam nomes mais específicos, por exemplo, condroblastos, células

cartilagenosas, e osteoblastos, células ósseas, que após maturação se transformam em células condrócitos e osteócitos, respectivamente. Ambas são responsáveis pela constante renovação e manutenção da matriz extracelular e pela produção de macromoléculas extracelulares.^{29,34}

O tecido cartilagenoso é revestido pelo pericôndrio, o qual é constituído de fibrilas contínuas de colágeno tipo I e II, músculos radiais e sais de cálcio, que fortalece o tecido. Essa proteína mantém e repara a estrutura celular da cartilagem, dando resistência, elasticidade e contração reversível, responsável pela entrada e saída de água.^{25,34,36}

O colágeno é a proteína mais abundante nos vertebrados e principal constituinte da matriz extracelular dos tecidos conjuntivos, representa cerca de 30% do total de proteínas presentes nos organismos multicelulares, dando estrutura e sustentação aos tendões, cartilagens, ossos e peles. A presença dessa proteína é exclusiva em células animais.^{34,35,36} Industrialmente, essa proteína é proveniente de fonte animal, principalmente dos tecidos conectivos de origens bovina e suína, tais como ossos, cartilagens, peles, músculos, tendões e demais tecidos.¹⁴⁻³⁷

A proteína colágena é fibrosa devido ao seu arranjo tridimensional em forma de tripla hélice, composta por três cadeias α polipeptídicas, com cerca de 1000 resíduos de aminoácidos, envolvidas lado a lado em longos filamentos, rígidos e de natureza lipofílica.^{15,16,35,36,38}

As cadeias polipeptídicas individuais de colágeno são sintetizadas pelos ribossomos ligados à membrana basal e liberados no lúmen do retículo endoplasmático. Os precursores de colágeno, pro-cadeia- α , possuem pequenos peptídeos-sinal amino-terminal necessários para dirigir o polipeptídeo nascente para o retículo endoplasmático (RE), como também, possuem propeptídeos, aminoácidos adicionais nas extremidades N e C terminal. No RE, ocorre a hidroxilação (lisil oxidase) das prolínas e lisinas para formarem a hidroxíprolina e hidroxilisina, respectivamente. Acontece também a glicosilação de algumas hidroxilisinas. As três cadeias pró- α se entrelaçam por ligações hidrogênio para formar o tropocolágeno, ou seja, molécula helicoidal de três fitas, como representado na Figura 10 (a).^{34,38}

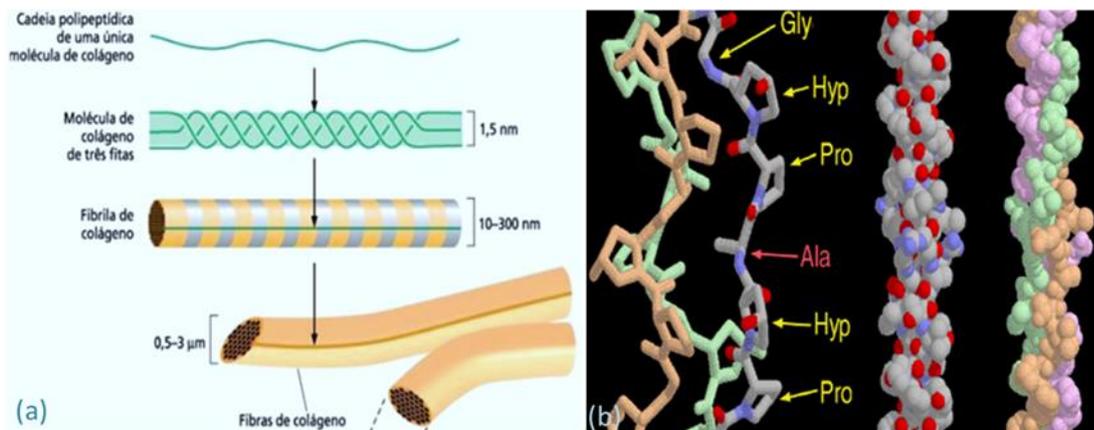


Figura 10. (a) Formação das fibras de colágeno; (b) sequência de aminoácidos em três cadeias polipeptídicas compoendo a tripla hélice do colágeno.³⁹

Num polipeptídeo de colágeno tipo I, $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$, esses filamentos se formam por domínios com repetições de tripeptídeos, Gly-X-Y, envolvidos em um arranjo de tripla hélice, vide Figura 10 (b), onde Gly é glicina, X e Y são comumente prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp), respectivamente.^{34,36}

A Figura 11 ilustra um tripeptídeo formado pela sequência dos aminoácidos Gly, Pro e Hyp. O colágeno tipo II, $[\alpha 1(II)]_3$, é formado por três cadeias $\alpha 1(II)$ e é típico da cartilagem. Outros tipos de colágeno, por exemplo, o tipo IX, as três cadeias α hélices são diferentes. Até o momento, já foram identificados cerca de 29 tipos de colágenos e 25 cadeias α de colágenos diferentes. Em todos os tipos de colágeno, a glicina é o aminoácido predominante, seguida da prolina. Este aminoácido estabiliza a conformação da hélice em cada cadeia α e a glicina permite o agrupamento das três cadeias α hélices para a formação da super-hélice de colágeno.^{14-16,34,37,38}

No tecido conjuntivo, os principais tipos de colágeno encontrado são, I, II, III, V e XI, fibrilares, que se agregam para formar longas fibrilas de colágeno, presentes nos ossos, dentina, tendões, capsulas de órgãos e na derme. O tipo I é o principal colágeno da pele e ossos e, também, o mais comum. Os tipos IX e XII, associados a fibrilas, unem as fibrilas umas às outras e a outros componentes da matriz extracelular. Os tipos IV e VII, formadores de rede; o tipo IV se agrega em uma camada semelhante

a uma rede que constitui a maior parte da lâmina basal, e o tipo VII é encontrado nas fibrilas que ancoram as fibras de colágeno do tipo I à lâmina basal.³⁴

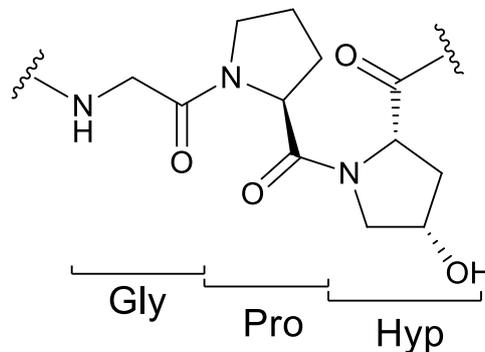


Figura 11. Sequência dos aminoácidos Gly, Pro e Hyp formando um tripeptídeo.

1.4.1 Extração e Caracterização do Colágeno de Biomassa Residual de Elasmobrânquios

O interesse pelo colágeno para aplicações em produtos cosméticos e alimentares fez aumentar as investigações voltadas às atividades biológicas dessa proteína, como também na busca de novas fontes para sua obtenção. Essas investigações, associadas ao elevado consumo de arraias e tubarões na Ásia, implicaram em algumas pesquisas para o desenvolvimento de metodologias visando o isolamento e caracterização dessa proteína a partir de cartilagens e peles de elasmobrânquios.

No entanto, esses subprodutos como fonte de obtenção de colágeno ainda são pouco explorados por boa parte da comunidade científica mundial, já que são limitadas as referências bibliográficas dentro dessa abordagem.

As condições apropriadas dos métodos de isolamento e caracterização do colágeno a partir de cartilagens residuais de tubarões e arraias são fundamentais para a preservação e identificação de suas propriedades físico-químicas e funcionais.

Estas são responsáveis pelo seu uso como matéria-prima nos processos de produção de biomateriais com possíveis aplicações nas indústrias fotográficas, alimentares, farmacêuticas, cosméticas e na área biomédica.¹⁵

Kittiphattanabawon e colaboradores.¹⁵ isolaram e caracterizaram o colágeno-ácido solúvel (ASC) e o colágeno pepsina solúvel (PSC) a partir das amostras de pele de Tubarão-bambu *brownbanded* (*Chiloscyllium punctatum*). O ASC foi extraído com ácido acético e precipitado com cloreto de sódio na presença de tampão tris, e o resíduo não dissolvido obtido da extração ácida foi usado para a extração de PSC com ácido acético e pepsina suína, tal procedimento foi referência dos artigos que serão citados a seguir e encontra-se mais detalhado na parte experimental desta dissertação. Os autores utilizaram como padrões, o colágeno tipo I extraído da pele de bezerro e colágeno tipo II extraído da cartilagem de suíno.

Com base em padrões de proteínas, o ASC e PSC foram caracterizados por eletroforese (SDS-PAGE), demonstrando a maior presença de cadeias α e β , e menores quantidades de cadeia γ . Os espectros de FTIR de ambos foram bem semelhantes. As temperaturas de transição máxima do ASC e PSC, medidas por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), foram respectivamente 34,45 °C e 34,52 °C. Ambos os colágenos apresentaram elevados teores de proteínas, nas quais a glicina foi o aminoácido em maior quantidade, observada em um analisador de aminoácidos. Os rendimentos foram 9,38% do ASC e 8,86% do PSC, calculados com base no peso seco.¹⁵

Chi e coautores¹⁴ realizaram a caracterização do colágeno-ácido solúvel (ASC), extraídas das amostras de cartilagens de três espécies de elasmobrânquios, Tubarão-martelo (*Sphyrna lewini*, ASC-S), Raia vermelha (*Dasyatis akajei*, ASC-D) e raia (*Raja porosa*, ASC-R), utilizando o colágeno extraído da pele de bezerro (SSC) como padrão. Após a extração pelo método anterior, Kittiphattanabawon,¹⁶ realizou-se a análise de aminoácidos que identificou a presença de resíduos de aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina entre outros. Os colágenos encontrados, provavelmente eram dos tipos I e II, constituídos de estruturas soltas, fibrosas e porosas, observados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os rendimentos foram 5,64% do ASC-S, 8,72% do ASC-D, 6,74% do ASC-R, baseados no peso seco.

Jeevithan *et al.*³⁷ isolaram o ASC, PSC e gelatina a partir das cartilagens de Tubarão *silvertip* (*Carcharhinus albimarginatus*), conforme o método já citado. A caracterização desses materiais mostrou que a gelatina apresentava um maior teor de hidroxiprolina em relação ao ASC e PSC. Os espectros de infravermelho (FTIR) mostraram uma menor intensidade do pico da amida I da gelatina em comparação aos colágenos, sugerindo que o processo de isolamento afetou a estrutura em tripla hélice da gelatina.

1.4.2 Aplicações Tecnológicas do Colágeno

O desenvolvimento de novas tecnologias para obtenção de biomateriais a base de colágeno, dotados de propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e atóxicas, levaram aos avanços nas áreas alimentar, biomédica, cosmética, farmacológica e odontológica. Portanto, essa proteína tem sido foco de investigações nos diferentes segmentos da sociedade, que vêm apostando em sua versatilidade para que possa ser processada na forma de gel, filme, pó, matrizes, esponjas hemostáticas e outras.

Uma das aplicações do colágeno é para a produção de gelatina, obtida pelo enfraquecimento da estrutura do colágeno que ocorre quebrando as ligações cruzadas intramoleculares incluindo covalente e ligações de hidrogênio, através das alterações de pH e temperatura.⁴⁰

Kasankala e coautores⁴¹ realizaram um trabalho de comparação entre as gelatinas de Peixe carpa (*Catenopharyngodon idella*), bovina e suína, concluindo então o teor de hidroxiprolina de gelatina de pele de carpa (11,3%) era ligeiramente maior do que a de gelatina de pele de bovino (11,2%) e um pouco menor do que a gelatina de pele de porco (13,2%). Possivelmente, a presença de hidroxiprolina promove alta resistência à gelatina.⁴⁰

Ogasawara e colaboradores⁴² registraram uma patente em que desenvolvem um aditivo para bebidas lácteas ácidas compreendendo um peptídeo de colágeno de baixo peso molecular, produzido através da hidrólise do colágeno em moléculas

inferiores e um estabilizador. O colágeno obtido foi a partir dos tecidos conectivos, peles e ossos de bovinos e suínos. Com isso, as expectativas dos autores com essa invenção são melhorar a elasticidade e tensão da pele, promover a absorção de cálcio pelos ossos e ativar os neurotransmissores. Além disso, determinaram que a bebida láctea ácida apresenta uma redução do sabor desfavorável, originado pelo estabilizador, devido a ação do peptídeo.

Sousa e Oliveira⁴³ transformaram os tecidos suínos em materiais compatíveis com o organismo humano. Para o desenvolvimento desse estudo, foi utilizado colágeno gelificado sustentável extraído de serragens e aparas de *wet-blue* (resíduos sólidos de curtumes). A pele suína foi purificada e esse colágeno foi utilizado para o fechamento de seus poros e para a reposição do colágeno perdido pela pele suína durante a realização dos processos de purificação, obtendo assim, uma matriz de pele humana artificial.

PARTE EXPERIMENTAL

2 PARTE EXPERIMENTAL

Os procedimentos químicos e biológicos adotados neste estudo ocorreram nos laboratórios de pesquisa da Universidade de Brasília (UnB) – Laboratório de Isolamento e Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO) no Instituto de Química, Laboratório do Departamento de Ciências Fisiológicas no Instituto de Biologia e Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol) da Faculdade de Saúde. Para a condução dos mesmos, tomou-se as seguintes estratégias de ação:

- Adquiriu-se 1 kg de arraia e 1 kg de cação originários do Sul do Brasil, em postas congeladas, junto ao estabelecimento Super Adega S.A. Atacadista de Alimentos Ltda., Brasília-DF, Brasil. Até a sua utilização, permaneceram por cerca de 1 mês no freezer (-20 °C) em suas embalagens originais de polietileno, que constavam a identificação da empresa fornecedora e o selo do SIF/DIPOA, além de outros dados.
- A biomassa residual de elasmobrânquios – cartilagens das nadadeiras peitorais de arraia (*Rajidae spp*) e das vértebras da espinha dorsal de Cação-azul (*Prionace glauca*) – foi aproveitada como matéria-prima para a obtenção do colágeno.
- 7 amostras de 30 g de cartilagens de arraia e cação foram utilizadas como material de partida para se extrair o colágeno em meio ácido, e após a sua caracterização, foi denominado de Colágeno Ácido Solúvel (ASC).
- As etapas de extração, purificação e caracterização do ASC foram realizadas individualmente para cada uma das 7 amostras, com exceção apenas da eletroforese e mapeamento peptídico que ocorreram de modo simultâneo.
- Todos procedimentos experimentais ocorreram à temperatura de 4 °C, por meio de banho de gelo. Este recurso, entretanto, não foi necessário aos processos de centrifugação e diálise que sucederam, respectivamente, em centrífuga

refrigerada e em câmara fria, como também para a caracterização (eletroforese, mapeamento de peptídeos, UV-Vis, FTIR e TG/DTG).

- Nos intervalos maiores entre algumas etapas procedimentais, as amostras de ASC foram acomodadas em recipiente de polipropeno e mantidas a -20 °C no freezer até o seu uso.
- Os processos de centrifugação, diálise e liofilização do ASC precederam as técnicas para a sua caracterização, tais como Espectroscopia de UV-Vis e FTIR; Análises térmicas de TG/DTG e DSC; Eletroforese SDS-PAGE e Mapeamento Peptídico.
- O tratamento de dados obtidos das técnicas supracitadas se deu a partir do programa *OriginPro 8*.
- As estruturas moleculares dos compostos químicos foram representadas por meio do programa *ChemDraw Ultra 7.0*.
- As soluções utilizadas nos procedimentos experimentais foram preparadas na concentração especificada à cada uma de suas etapas.

2.1 MATERIAIS

Biomassa residual de elasmobrânquios – 30 g de cartilagens das nadadeiras peitorais de arraia (*Rajidae spp*) e 30 g de cartilagens das vértebras da espinha dorsal de Cação-azul (*Prionace glauca*).

Reagentes e solventes de grau analítico, sendo todos obtidos de fontes comerciais pela UnB, vide Tabela 5.

Tabela 5. Reagentes, suas respectivas marcas e graus de pureza, P.A.

Reagentes	Marcas	Teor (%)
Acrilamida (PlusOne™ Acrylamide Page)	GE Healthcare	≥ 99,0
Acido acético	Vetec	99,7
Acido clorídrico	Vetec	37,0
Acido etileno diaminotetra-acético (EDTA)	Vetec	99,7
Azul de bromofenol	Sigma	_____
Beta mercaptoetanol (β-ME)	GE Healthcare	99,0
Cloreto de sódio	Vetec	99 – 100,5
Azul brilhante de Coomassie R-250 (CBBR-250)	Merck	_____
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Riedel-de-Haën	90,0
Glicerol	Sigma	99,5
Hidróxido de sódio	Vetec	99,0
Padrão SeeBlue® plus 2	Invitrogen™	_____
Metanol	Sigma	99,0
Persulfato de amônio (APS)	Fisher Biotech	_____
Tetrametiletilenodiamina (PlusOne™ TEMED)	GE Healthcare	99,0
Tripsina 3.4.21.4	Sigma-Aldrich	_____
Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	Sigma-Aldrich	99,9

2.2 MÉTODOS

A partir de cartilagens de arraia e de cação, realizou-se a extração do ASC, fundamentada no método descrito por Kittiphattanabawon e colaboradores.¹⁶ No fluxograma da Figura 12, apresenta-se, de modo estruturado, as suas etapas e, mais detalhadamente, no corpo do texto das seções deste capítulo.

2.2.1 Etapas de Extração do ASC

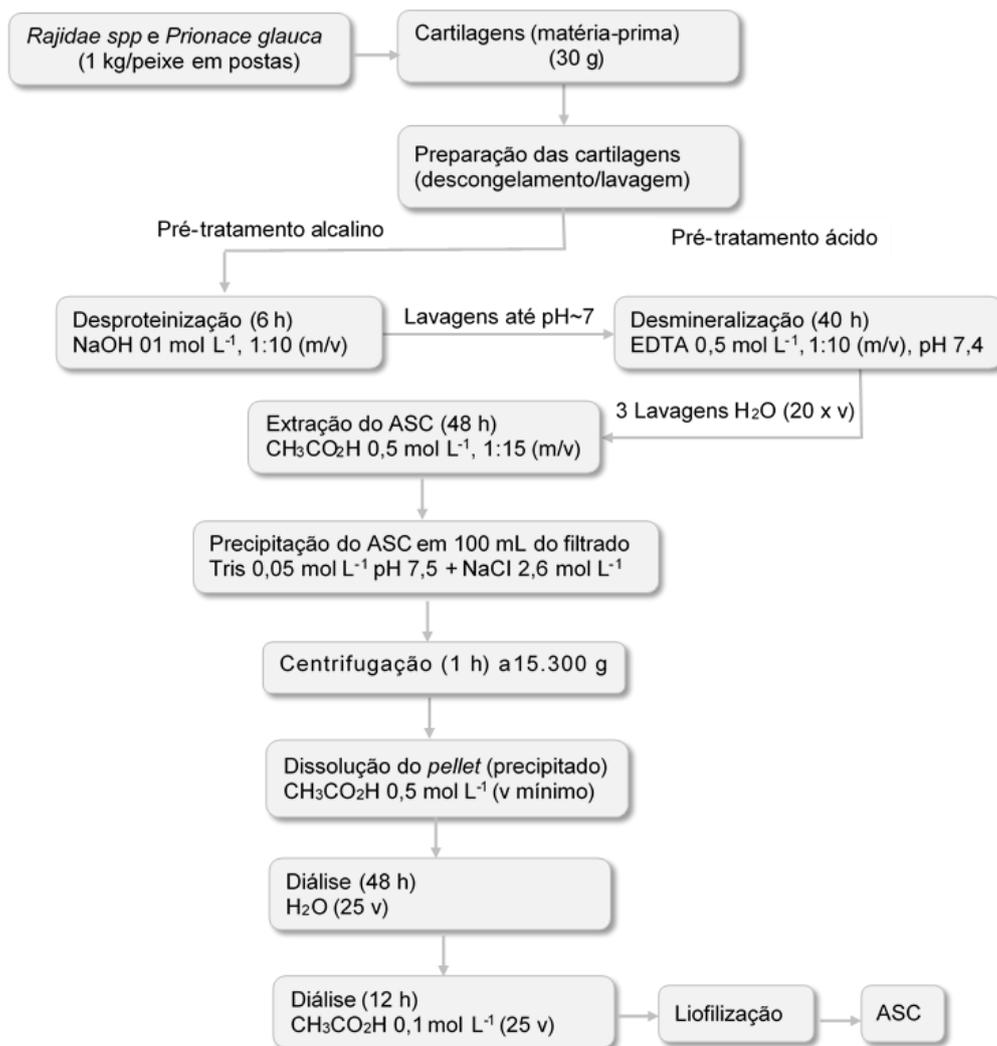


Figura 12. Fluxograma de extração do ASC a partir de cartilagens de arraia e de cação.

2.2.1.1 Preparação das Cartilagens de Elasmobrânquios

As cartilagens de elasmobrânquios passaram por uma preparação prévia, e só depois, submetidas à etapa de pré-tratamento, a 4 °C. Na etapa de preparação, as postas de arraia e de cação (1 kg de cada) foram retiradas do freezer, -20 °C, descongeladas e lavadas abundantemente em água corrente até atingirem uma temperatura interna de 5 °C. Em seguida, com o auxílio de uma faca de corte, raspou-se toda carne residual da superfície dessas postas de modo a obter apenas as cartilagens, que foram lavadas com água corrente fria (≤ 10 °C), cortadas em pequenas partes (~1-2 cm), com uma tesoura, e maceradas junto com gelo em utensílio de porcelana (almofariz e pistilo). Por fim, lavadas de novo com água fria até a retirada de todo o odor excedente de amônia. A Figura 13 corresponde a esse processo.

Estando as cartilagens preparadas, separou-se 7 amostras de 30 g, sendo 4 de arraia e 3 de cação, designadas respectivamente de AA, A1, A2 e A3, e C1, C2 e C3. Como teste preliminar, AA (amostra de arraia) foi a primeira amostra submetida à extração do ASC, e preservou-se as outras sob refrigeração de -20°C (freezer) em tubos Falcon de polipropeno de 50 mL, tampados e identificados, até serem utilizadas para tal fim.

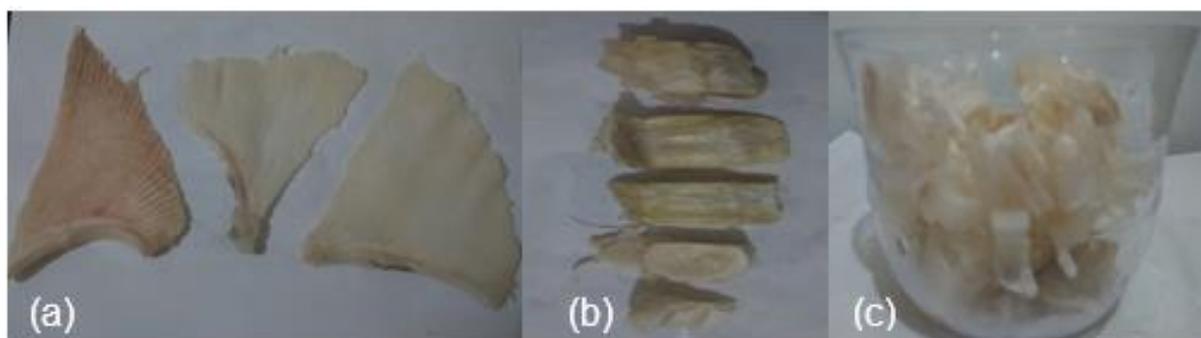


Figura 13. Cartilagens de elasmobrânquios: (a) barbatanas de arraia, (b) vértebras da espinha dorsal de cação e (c) vértebras dorsais de cação em cortes de ~1-2 cm.

2.2.1.2 Pré-tratamento das Cartilagens de Elasmobrânquios

Antes de terem sido submetidas à etapa de extração do ASC, que sucedeu a 4 °C, as cartilagens passaram pela etapa de pré-tratamento, desproteíntização e desmineralização, para a remoção de componentes estruturais da matriz cartilaginosa, tais como polissacarídeos, glicoproteínas e outras proteínas, também, íons Ca^{2+} presentes nessa matriz pela deposição de cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$.^{34,36}

Desproteíntização

Para a remoção de proteínas não colágenas que estão presentes na matriz extracelular dos tecidos animais, dando assim condições ideais à extração do ASC, as cartilagens passaram pelo processo de desproteíntização. Depois de descongeladas, foram imersas em 300 mL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, na proporção de 1:10 (m/v), contidos em recipiente de 500 mL de polietileno de alta densidade. Com o auxílio de um agitador mecânico (GKH, modelo GT-21 Motor Controller), esse sistema ficou sob agitação contínua por 6 h na velocidade de 333 rpm, e a troca da solução alcalina ocorreu a cada 2 h. Na sequência, lavou-se as cartilagens com água gelada até obter um pH neutro ou fracamente alcalino da água de lavagem.

Desmineralização

A finalidade desta etapa é promover a retirada de íons metálicos divalentes, Ca^{2+} e Mg^{2+} , para facilitar a dissociação dos tecidos mineralizados. Isto pode ocorrer pela ação de um quelante catiônico, no caso, EDTA, que, por meio do sequestro desses cátions metálicos, é capaz de quebrar as interações proteína-proteína que mantêm as células unidas uma com as outras, ou com a matriz extracelular nos tecidos animais.³⁴

Logo, em um béquer de vidro de 500 mL, colocou-se 300 mL de solução de EDTA 0,5 mol L⁻¹, pH 7,4, na proporção de 1:10 (m/v) e acrescentou-se as cartilagens de arraia e cação desproteíntizadas. Durante 40 h, esse sistema foi continuamente agitado a 333 rpm com um agitador mecânico (modelo já aludido), e a troca da

solução sucedeu a cada 8 h. Decorrido esse tempo, a solução desmineralizadora foi substituída por 20 volumes, 6 L, de água deionizada gelada na qual as cartilagens foram lavadas por 10 min sob agitação constante a 333 rpm. Este processo de limpeza ocorreu três vezes.

2.2.1.3 Extração de Colágeno Ácido Solúvel (ASC)

Concluída a etapa de pré-tratamento, iniciou-se a extração de ASC em meio ácido. Para tal, as cartilagens foram imersas em béquer de vidro de 500 mL, contendo 450 mL de ácido acético $0,50 \text{ mol L}^{-1}$, na proporção de 1:15 (m/v) e submetidas à agitação contínua a 333 rpm, com o mesmo agitador, por 48 h. Em seguida, filtrou-se essa mistura em funil de vidro revestido com duas camadas de gaze na qual o resíduo cartilaginoso ficou retido, e o filtrado (solução extratora) foi coletado no elermeyer de 500 mL de onde se recolheu uma alíquota de 100 mL para a precipitação do ASC. A Figura 14 mostra o sistema utilizado durante as referidas etapas.



Figura 14. Sistema utilizado nas etapas de pré-tratamento e extração.

Precipitação do ASC

Como as proteínas possuem muitos grupos laterais carregados, a sua solubilidade está associada à concentração dos sais dissolvidos, temperatura, pH e polaridade do solvente. Logo, a adição de sais e solventes, e variações de pH e temperatura podem induzir a sua precipitação. Por exemplo, em uma solução com baixa concentração de íons, a solubilidade aumenta à medida que os sais são adicionados (fenômeno *salting in*). Contudo, quanto se adiciona mais sal, a solubilidade da proteína decresce novamente, devido à competição por moléculas de água pelo sal adicionado (fenômeno *salting out*).³⁶

Portanto, para se chegar nas condições ideais à precipitação por *salting out* do ASC na solução filtrada – alcançada pela adição de NaCl até uma concentração final de $2,6 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de Tris(hidroximetil)aminometano $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,5 –, primeiramente, dos 450 mL desta, recolheu-se uma alíquota de 100 mL na qual foi ajustado o seu pH de 3,8 até 7,5. Para isto, acrescentou-se 0,61 g do tampão Tris(hidroximetil)aminometano que alterou o seu pH para 5, e na sequência, por meio de titulação com NaOH 8 mol L^{-1} sob agitação magnética e banho de gelo, chegou-se ao pH ideal (7,5). A partir daí, adicionou-se 15,19 g de NaCl que favoreceram a precipitação do ASC nesse meio, observada pela a formação de um gel translúcido (dispersão coloidal), como pode ser observado na Figura 15 (a).

Centrifugação do ASC

A centrifugação é uma técnica útil para se separar macromoléculas de uma solução, pois a sua velocidade de sedimentação é aumentada quando são submetidas a acelerações enormes.³⁶

No caso de separação do ASC, a dispersão coloidal foi colocada em *ependorfs* (microtubos de polipropeno de 1,5 e 2,0 mL) e exposta aos campos centrífugos de 15.300 g durante 1 h, em centrífuga refrigerada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (modelo Sigma Laborzentrifugen 2K15), Figura 15 (b). Finalizada a centrifugação, imediatamente, os *pellets* (precipitados) foram separados dos sobrenadantes, Figura 15 (c).

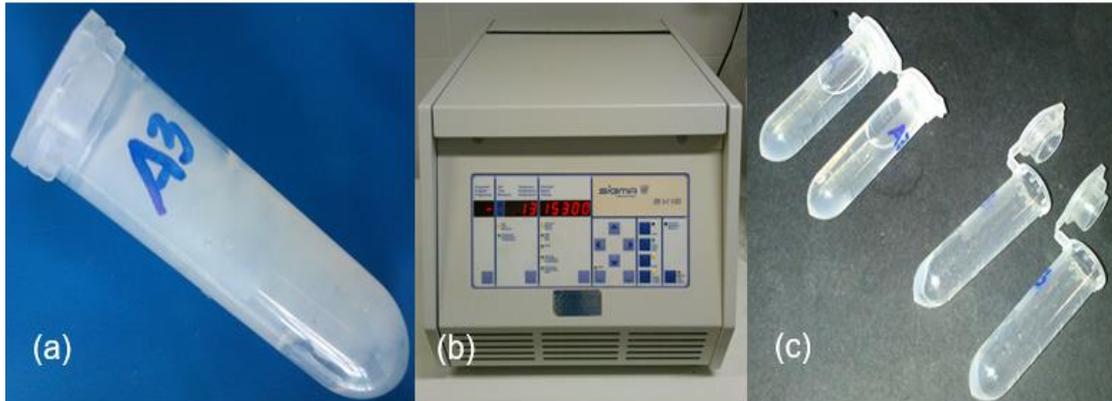


Figura 15. (a) ASC precipitado - gel translúcido, antes da centrifugação, (b) centrífuga refrigerada e (c) ASC centrifugado - *pellets* e sobrenadante acima, e *pellets* isolados à direita.

Diálise do ASC

A base da diálise é a difusão de solutos.³⁶ Partindo-se dessa premissa, o excesso de sal que levou à precipitação do ASC foi removido através dessa técnica.

Por meio de uma pipeta de Pasteur, introduziu-se um volume mínimo (~0,5 mL) de ácido acético 0,5 mol L⁻¹ nos microtubos contendo os *pellets* (ASC precipitado) para que ocorresse a sua solubilização. Em seguida, todo o material contido nos microtubos foi transportado para a membrana seletivamente semipermeável, cujos poros retiveram as macromoléculas e permitiram apenas a difusão de espécies químicas menores até que atingissem o equilíbrio durante o processo de diálise.

Tal técnica ocorreu em câmara fria a 4 °C; inicialmente, por 12 h em 25 volumes, 500 mL, de ácido acético 0,1 mol L⁻¹ e na sequência, durante 48 h em 25 volumes de água destilada. Ambas as soluções estavam em béquer de vidro de 500 mL e sob agitação magnética, como no esquema da Figura 16.

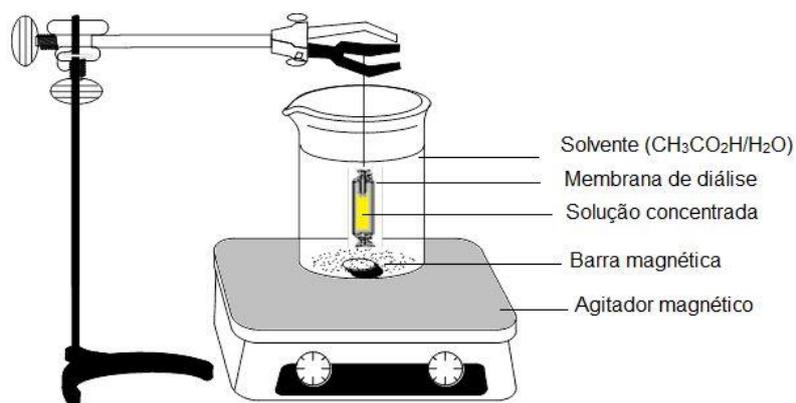


Figura 16. Esquema representativo do processo de diálise.

Liofilização

A desidratação do ASC ocorreu pelo processo de liofilização, congelamento sob vácuo da amostra e sublimação do gelo. A amostra a ser desidratada foi introduzida em tubo Falcon de 50 mL (polipropeno) que, durante o processo de secagem, 48 h, ficou acoplado ao liofilizador (modelo L101 LIOTOP), apresentado na Figura 17.



Figura 17. Liofilizador.

Após a liofilização da amostra de ASC, o gel translúcido, como observado nas Figuras 15 (a) e (c), adquiriu aspecto e textura semelhantes às de um algodão-doce, vide Figura 18.



Figura 18. ASC liofilizado: Amostra A3.

Rendimento do ASC

O rendimento da extração foi calculado com base na massa obtida do ASC liofilizado, massa seca, em comparação com a massa inicial da cartilagem seca e no fator de conversão 4,5 (razão 450 mL/100 mL), segundo a equação 1:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa inicial}} \times 4,5 \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2 Caracterização do ASC

2.2.2.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A espectroscopia de absorbância na região do UV-Vis é empregada para acompanhar a purificação de uma proteína.³⁶ Essa técnica serviu para avaliar o êxito

do processo de desproteinização na etapa de pré-tratamento do ASC, através da avaliação de seus espectros de absorbância obtidos.

Segundo o método de Kittiphattanabawon e colaboradores,¹⁵ preparou-se a amostra de ASC para a análise de UV-Vis: 4 mg de ASC liofilizado foram dissolvidos em 4 mL de ácido acético 0,5 mol L⁻¹ na razão 1:1 (m/v), entretanto, a sua solubilização foi incompleta, e então, precisou-se filtrar esse sistema em funil de vidro com duas camadas de gase. Feito isso, ajustou-se a linha de base com ácido acético 0,5 mol L⁻¹, e a solução foi posta em cubeta de quartzo, caminho óptico de 1 cm, e submetida à análise em um espectrofotômetro (Varian Carey 5000-UV-VIS-NIR), no intervalo de comprimento de onda de 200-800 nm, velocidade de varredura de 50 nm min⁻¹, à temperatura ambiente.

2.2.2.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica foi empregada para a identificação de grupos funcionais presentes na amostra de ASC e, assim, determinar a sua composição estrutural. Isto é possível pela sensibilização de modos vibracionais das ligações nas moléculas por meio da interação com radiação eletromagnética de frequência apropriada.

Com base na metodologia de Kittiphattanabawon e colaboradores,^{15,16} realizou-se a espectroscopia de FTIR a partir de 1 mg de ASC liofilizado. Obteve-se os seus espectros em um espectrofotômetro (modelo Varian 640-IR-FT-IR) com uma resolução de 4 cm⁻¹, 16 varreduras, no intervalo de frequência de 4000-600 cm⁻¹, à temperatura de 25 °C. Antes de se adquirir os espectros do ASC, o acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) foi montado no compartimento, e a linha de base ajustada. Para isto, executou-se o *background* (espectro de fundo) com o cristal limpo e sem a referida amostra.

2.2.2.3 Termogravimetria (TG) e Termogravimetria Derivada (DTG)

A aplicação das análises termogravimétricas, TG/DTG, serviu para investigar o comportamento térmico, perda de massa, do ASC frente a uma taxa de aquecimento em um dado intervalo de temperatura. As curvas de TG/DTG do ASC foram medidas de acordo com a metodologia de Santos e colaboradores,⁴⁴ com pequenas adaptações. Colocou-se 5 mg de ASC liofilizado em um cadinho de platina, e um outro vazio serviu como referência à análise de sua estabilidade térmica, realizada em um equipamento (Shimadzu, modelo DTG-60H), a uma taxa de aquecimento de 20 °C min⁻¹ no intervalo de 20-900 °C, em atmosfera de N₂ com vazão 30 mL min⁻¹.

2.2.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A fim de medir a estabilidade térmica do ASC, isto é, a sua temperatura de desnaturação (Td), realizou-se a técnica de DSC baseando-se no método de Kittiphattanabawon e colaboradores.^{15,16} Reidratou-se 5 mg de ASC com 200 µL de água deionizada na proporção 1:40 (m/v). Após dois dias de repouso a 4 °C, acomodou-se 7 mg dessa amostra em cadinho selado de alumínio, sendo que um desse, vazio, foi usado como referência, e se deu início à análise em um calorímetro (Shimadzu, modelo DSC-60). A calibração da temperatura foi feita com termograma de índio, sendo que a varredura das duas curvas ocorreu em 1 °C min⁻¹ no intervalo de temperatura de 20-50 °C por meio de arrefecimento com N₂ líquido, em atmosfera inerte, He, com fluxo de vazão 30 mL min⁻¹. Para o estudo da temperatura de transição (Tmax), ou seja, da temperatura de desnaturação (Td) considerou-se apenas a segunda curva de varredura.

2.2.2.5 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Segundo o método de Li e colaboradores,⁴⁵ realizou-se simultaneamente a eletroforese em gel de poliacrilamida para as 7 amostras de ASC (4 de arraia e 3 de cação).

Esse método foi utilizado para se estimar o tamanho (a massa molecular) e a composição das subunidades do ASC. Primeiramente, colocou-se 1 mg de cada amostra de ASC (liofilizado) em *ependorfs* e se acrescentou 200 μL (0,2 mL) de SDS 5%, na proporção de 1:2 (m/v). Depois, essa mistura ficou durante 1 h sob incubação a 85 °C, em um banho-maria (Grant Y28).

Enquanto isso, preparou-se o gel de poliacrilamida na concentração conforme protocolo: 4% de gel de empilhamento, *stacking*, (tampão Tris-HCl 1 mol L⁻¹, pH 6,8) e 7,5% de gel de separação, *separating*, (tampão Tris-HCl 1,5 mol L⁻¹, pH 8,8).

Depois de incubadas as amostras, fez-se a sua centrifugação (Centrífuga Sigma Laborzentrifugen 2K 15) a 5.000 g durante 10 min, à temperatura ambiente para a remoção dos *pellets*. Estes permaneceram nos próprios microtubos, e com uma micropipeta, recolheu-se apenas a parte sobrenadante, cerca de 15 μL de cada amostra foram transferidos para outros microtubos e misturados com 5 μL tampão de carregamento da amostra (Tris-HCl 60 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo 25% de glicerol, 2% de SDS e 0,1% de azul brilhante de Coomassie R-250 (CBBR-250), na proporção 4:1 (v/v), na presença de 10% de beta mercaptoetanol (β -ME).

Inseriu-se cada amostra de ASC (4 de arraia e 3 de cação) em poços individuais da cuba de eletroforese (BIO-RAD Mini-PROTEAN® Tetra System), com capacidade de 20 μL , já contendo gel de carregamento, e se deu início à corrida eletroforética em fonte BIO-RAD power/pac 3000, corrente de 20 mA, na faixa de tensão elétrica 100-130 V durante 1 h:30 min. O equipamento de eletroforese está apresentado na Figura 19.



Figura 19. Equipamento de eletroforese.

Ao término da análise, o gel foi retirado do aparelho e corado ao ser imerso no corante azul, solução de CBR-250 0,1% (m/v), metanol 45% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), por 30 s e sob aquecimento em microondas. Em seguida, descartou-se o corante. Então, para evidenciar as bandas referentes às proteínas, o gel foi descorado por 1 h na solução de metanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), sob agitação magnética. Por fim, estimou-se a massa molecular (MM) das amostras de ASC pela comparação com a do marcador de proteína de alta massa molecular, padrão SeeBlue® Plus 2.

2.2.2.6 Mapeamento de peptídeos

O mapeamento peptídico das amostras A e C de ASC seguiu o procedimento realizado por Zhang e colaboradores.⁴⁶

Introduziu-se 1 mg de cada amostra de ASC (liofilizado) em *ependorfs* nos quais se acrescentou 200 μ L (0,2 mL) de ácido acético 0,5 mol L⁻¹, pH 2,7, na proporção de 1:2 (m/v), para a sua dissolução. Após isto, adicionou-se a tripsina (EC 3.4.21.4, 1:250) na proporção enzima/substrato de 1:2 (m/m) à essa solução, que depois foi incubada a 37 °C por 3 h em banho-maria. Após incubação, coletou-se 15 μ L desse material e o transferiu para outros microtubos contendo 5 μ L de tampão de

corrida beta mercaptoetanol. Depois de aquecida em banho-maria a 100 °C por 3 min, essa mistura foi introduzida nos poços individuais da cuba de eletroforese, (modelo apresentado acima) e em seguida, para separar os peptídeos gerados pela digestão com protease, iniciou-se a corrida eletroforética conforme apresentada em tópico anterior. Ao término da corrida, 1 h, o gel foi revelado do mesmo modo já descrito acima. O mapa dos peptídeos foi comparado com o da literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E ÁCIDO DAS CARTILAGENS

Desproteínização

Considerando-se a ionização das cadeias laterais das proteínas, em pH abaixo ou acima do seu ponto isoelétrico ou isoônico (pI), que geram a repulsão eletrostática das macromoléculas,^{14,48,49,51} como também, que em pH = 7 existe a predominância das formas iônicas dos resíduos de aminoácidos com cadeias laterais carregadas,^{35,36,49} logo, considera-se que o uso da solução de hidróxido de sódio (NaOH) neste processo, provavelmente, permitiu que o grupo carboxila das cadeias laterais dos ácidos aspártico e glutâmico tenha permanecido desprotonado ($-\text{COO}^-$), ao passo que o grupo amino das cadeias laterais da arginina, lisina e histidina fosse desprotonado ($-\text{NH}_2$).

De acordo com Boran e colaboradores,⁴⁰ a alcalinização leva a glutamina e a asparagina a perderem seus grupos amino, e isto acarreta a diminuição do pI do colágeno quando os mesmos são convertidos em resíduos de ácidos glutâmico e aspártico, respectivamente.

Portanto, pode-se inferir, que o pH > 7 foi determinante para que as interações intermoleculares entre aglomerados proteicos e não proteicos fossem desestabilizadas, e desta forma, as proteínas não colágenas foram solvatadas pelo solvente alcalino, sendo então separadas.

Este procedimento teve como propósito a eliminação de proteoglicanos, polissacarídeos, proteínas plasmáticas e outras proteínas não colágenas, de modo a viabilizar as condições ideais para o isolamento do ASC.^{14-16,47} Para este fim, baseou-se nas diferentes interações dessas macromoléculas com a solução de hidróxido de sódio (NaOH).³⁶

Supostamente, os grupos ionizáveis dos aminoácidos foram hidroxila (-OH) e amino ($-\text{NH}_2$) das cadeias laterais polares neutras, e carboxila ($-\text{COOH}$) das cadeias

laterais ácidas, permaneceram com suas cargas negativas. Também, pode ter ocorrido a quebra de ligações hidrogênio entre proteínas não-colágenas e os proteoglicanos, cujas cadeias GAGs, em pH fisiológico, apresentam os grupos sulfato ($-\text{SO}_3^-$) ionizado, conseqüentemente, a presença de contra-íons, como os cátions Na^+ , promoveu a remoção dessas macromoléculas. Em conseqüência disso tudo, e considerando-se que o *pI* do colágeno estava abaixo do pH da solução, pode-se deduzir, que a proteína alvo tenha sido separada das macromoléculas não-proteicas quando estas foram solubilizadas.^{36,48,49} Segundo Chi e colaboradores,¹⁴ a solubilidade do ASC é maior na faixa de pH 1 a 4, sendo máxima em pH 2, diminui significativamente em pH 7 e atinge a mínima em pH maior que 11.

Por fim, presume-se que o inchaço do tecido cartilaginoso, provocado pelo tratamento alcalino, favoreceu o afrouxamento da matriz e posterior remoção de macromoléculas. O êxito do resultado se baseia no tempo, temperatura e concentração da solução alcalina,²⁸ e Segundo Kittiphattanabawon e colaboradores,¹⁵ está relacionado a inexistência de um pico de absorção máxima a 280 nm da tirosina. Este fato pôde ser apurado pela análise de espectros de UV-Vis, Figuras 21, 22 e 23, os quais não apresentaram nenhuma absorção nesse comprimento de onda. Diante dos argumentos expostos, considera-se eficiência dessa etapa de desproteinização.

Ressalta-se, que o mesmo princípio foi considerado para extração do ASC em solução de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, que ocorreu sob condições brandas de pH. Segundo o relato de Shon e colaboradores,⁵⁰ a força do ácido afeta o pH do colágeno. Logo, tornou-se solúvel devido ao inchaço, após a desorganização de sua estrutura pela quebra de algumas ligações fracas.

Desmineralização

O objetivo desta etapa foi eliminar os íons Ca^{2+} presentes em alguns pontos calcificados da matriz cartilaginosa.^{15,16} Por esta razão, o processo é conhecido também como descalcificação.

Supostamente, esses cátions foram extraídos da referida matriz pela sua complexação com o EDTA em pH 7,4.¹⁴⁻¹⁶ Este valor corresponde à constante de formação ($\log K_f$ 10,69) do complexo metal-EDTA, $[\text{Ca}(\text{EDTA})]^{2-}$, que é específica aos

íons Ca^{2+} . Isto é, para uma complexação seletiva dessa espécie catiônica,⁴⁸ pois, na escala de pH mínimo para a titulação efetiva de íons metálicos com EDTA, o pH 7,4, corresponde aos os íons Ca^{2+} , está situado entre os valores de pH 7 e 8 para os respectivos íons Mg^{2+} e Sr^{2+} .⁴⁸ A Figura 20 representa tal complexo.

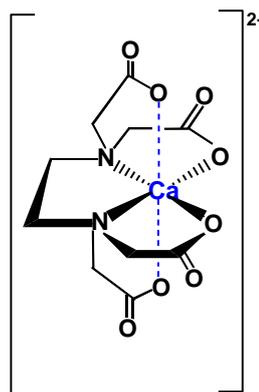


Figura 20. Complexo $[\text{Ca}(\text{EDTA})]^{2-}$.

Apresenta-se, a seguir, uma breve retomada à constituição do tecido cartilaginoso como forma de entender e demonstrar a complexidade de se extrair e purificar uma molécula alvo de seu meio natural, neste caso, o colágeno.

Para a realização dos procedimentos usuais de solubilização, filtração, centrifugação, diálise e eletroforese são imprescindíveis algumas informações das propriedades físico-químicas e afinidades biológicas da proteína. Por exemplo, massa molecular, solubilidade, carga elétrica, ponto isoelétrico, afinidade por ligantes, interações intra e inter-moleculares. O controle de pH, temperatura, enzimas degradativas, adsorção às superfícies e tempo de armazenamento é relevante para a estabilização da mesma durante os processos envolvidos.³⁶

Os tecidos cartilaginoso e ósseo são formas altamente especializadas de tecido conjuntivo cujos constituintes extracelulares são sintetizados por células fibroblastos mais específicas: condroblastos, produtores do colágeno tipo II, característico da matriz cartilaginosa, e osteoblastos, que secretam o colágeno tipo I da matriz

óssea.^{34,36} Os constituintes estruturais básicos dessas matrizes, além do colágeno, são a proteína elastina, os polissacarídeos, glicosaminoglicanos, e as glicoproteínas, proteoglicanos, laminina e fibronectina.^{34,35,36}

Os glicosaminoglicanos, denominados GAGs, são heteropolissacarídeos lineares compostos por unidades dissacarídicas alternadas, que na sua maioria estão presentes os grupos sulfato ($-\text{SO}_3^-$) e carboxilato ($-\text{COO}^-$). Estes grupos conferem alta densidade de cargas negativas ao longo da cadeia GAG e, assim, acaba por atrair cátions como Ca^{2+} , Na^+ e K^+ .^{34,36} As forças repulsivas entre grupos carregados vizinhos na cadeia são minimizadas em função de seu alto potencial hidrofílico, que leva à uma conformação estendida da mesma quando em solução.^{34,35}

Os proteoglicanos são glicoproteínas que consistem de uma proteína central à qual pelo menos uma cadeia lateral GAG está ligada covalentemente. No espaço extracelular, suas cadeias GAGs formam uma substância viscosa altamente hidratada na qual estão entrelaçadas as fibras elásticas, reticulares e colágenas. O agregano é o principal proteoglicano da cartilagem, sendo responsável pela sua consistência flexível, porém, bem resistente. Quando sua molécula, com cerca de 130 cadeias laterais GAGs, de sulfatos de condroitina e queratana, se associa por ligações não covalentes a uma única molécula linear de hialuronana (GAG não-sulfatada) gera um enorme agregado supramolecular.^{29,34-36}

A estrutura única em tripla hélice do tropocolágeno é formada por três cadeias polipeptídicas voltadas para esquerda, contendo cada uma delas, unidades repetitivas em uma sequência de três aminoácidos, geralmente, glicina, prolina e hidroxiprolina. Também, contêm altos índices de ácidos imino (hidroxiprolina e hidroxilisina, dois exclusivos aminoácidos modificados).⁴⁰

O endoesqueleto dos peixes cartilagosos é formado por cartilagem embrionária, isto significa que não é constituída por osso. Porém, torna-se calcificada quando os espaços da matriz cartilaginosa são preenchidos pela deposição de íons Ca^{2+} do fosfato de cálcio, na forma de cristais de hidroxiapatita.^{25,34,36} Este sal confere uma característica bem conhecida da coluna vertebral dos tubarões, a calcificação no corpo de suas vértebras.³⁴

A organização estrutural dos tecidos animais resulta de diversas interações entre as biomoléculas, principalmente colágeno e proteoglicanos.³⁶ A conformação destes últimos pode ser alterada drasticamente pela força iônica, condições osmóticas e pH do meio.³⁴ Isso porque os potenciais hidrofílico e aniônico de suas cadeias laterais GAGs atraem cátions como Na^+ , que são osmoticamente ativos e, por isso, levam a matriz a absorver grande volume de água, cuja pressão faz com que a mesma se distenda.^{34,36}

As proteínas apresentam uma variedade de formas que estão diretamente relacionadas com as interações entre seus aminoácidos. A ionização das cadeias laterais de alguns aminoácidos leva à distribuição de cargas ao longo da cadeia polipeptídica, conseqüentemente, essa propriedade elétrica acaba influenciando em sua solubilidade.³⁴⁻³⁶

As proteínas são consideradas ácidos e bases polipróticos, dependendo das condições de pH em que estão submetidas, podem doar ou receber mais de um próton.⁴⁸ Em pH isoelétrico do meio, os grupos ionizáveis amino ($-\text{NH}_2$) e carboxila ($-\text{COOH}$), estão nas respectivas formas: protonada ($-\text{NH}_3^+$) e desprotonada ($-\text{COO}^-$), ou seja, *zwitterion* neutro, de carga líquida igual a zero. Este valor é tido como referencial para a solubilidade de proteínas, uma vez que cada aminoácido, peptídeo e proteína tem o seu pI específico.^{34,48,49}

Para uma proteína, o ponto isoelétrico é o pH no qual a proteína não apresenta nenhuma carga líquida.⁴⁸ Logo, acima ou abaixo do mesmo, as proteínas estão carregadas positiva ou negativamente e poderão se solubilizar devido a maior interação com o meio aquoso e menor interação proteína-proteína (repulsão eletrostática).^{34,48,49} A diferença dos pI é vantajosa para separar uma mistura de aminoácidos ou proteínas.⁴⁹

Os resíduos de aminoácidos com cadeias laterais neutras têm pI próximos da neutralidade, pH 5,0-6,5. Já os com cadeias laterais ácidas têm pI em pH mais baixo, o qual impede a dissociação do grupo carboxílico extra da cadeia lateral; e os três aminoácidos com cadeias laterais básicas possuem pI em pH alto, evitando a protonação grupo amino extra da cadeia lateral.⁴⁹ Deste modo, um desses grupos

ionizáveis prevalecerá, isto é, na forma aniônica ou catiônica, ou ainda, zwitteriônica (dipolar), no pH que é estabelecido no pI da proteína em questão.^{36,49}

Na composição total de 19 resíduos de aminoácidos do ASC a partir da cartilagem de elasmobrânquios, cerca de 73% são neutros (47% apolares e 26% polares neutros), 16% básicos e 11% ácidos.^{14-16,37}

Os pontos isoelétricos do ASC isolado das cartilagens de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) e Tubarão-galha-preta (*Carcharhinus limbatus*) foram estimados em torno de 6,53 e 6,96, respectivamente, por Kittiphattanabawon e colaboradores.¹⁶ Também, estes pesquisadores obtiveram o valor 6,21 para o ASC extraído da pele de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*).¹⁵ O pI ~ 7 foi encontrado por Chi e colaboradores¹⁴ para o ASC das cartilagens de Tubarão-martelo (*Sphyrna lewini*, ASC-S), Arraia-vermelha (*Dasyatis akajei*, ASC-D) e Patim (*Raja porosa*, ASC-R). Li *et al.*⁴⁵ identificaram uma região de 6,0 a 9,0 para o pI de ASC obtido da pele e do osso de Cavala-espanhola (*Scomberomorus niphonius*). O pI 7,3 do colágeno em pó, extraído da pele da arraia *Raja kenoei*, foi encontrado por Shon e colaboradores.⁵⁰ Por fim, o pI 6,6 para o colágeno foi encontrado na literatura.³⁶

Os tecidos embrionários de vertebrados são facilmente dissociáveis quando tratados com EDTA e enzimas proteolíticas em baixas concentrações para a remoção de íons cálcio. Esse tratamento rompe as interações proteína-proteína que dependem de cátions bivalentes para manter a adesão celular da matriz extracelular.³⁴

Em virtude do efeito quelante do EDTA, seu uso é muito comum em química analítica e nas indústrias de alimentos para o sequestro de íons metálicos. Em meio aquoso e pH nos limites fisiológicos, esse poliácido atua como base de Lewis para formar complexos metálicos estáveis, metal-quelato, com os íons metálicos.^{48,52}

Rendimento de Extração do ASC

Conforme a Equação 1 já apresentada, calculou-se o rendimento de extração do ASC de cada amostra com base em sua massa liofilizada (seca). A análise estatística (realizada pelo programa Excell 2013 para Windows 10) forneceu as médias dos valores de rendimento com os desvios padrão de $1,40 \pm 0,10\%$ e $0,47 \pm$

0,28% para A (arraia) e C (cação), respectivamente. Esses valores estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Rendimento, média e desvio padrão das amostras A e C de ASC.

Amostra	Rendimento* (%)	Média ± Desvio padrão (%)
AA	1,80	—
A1	1,26	1,40 ± 0,10
A2	1,44	
A3	1,41	
C1	0,78	0,47 ± 0,28
C2	0,23	
C3	0,41	

*Rendimento calculado com base na massa liofilizada (seca) de ASC

Durante a etapa de precipitação do ASC da amostra AA, após adição de Tris, o ajuste de pH com NaOH 8,0 mol L⁻¹ deveria atingir o pH 7,5, porém chegou a 8,9. Portanto, foi necessário a sua redução com ácido acético. Por isto, a sua exclusão do cálculo da média e desvio padrão das amostras de arraia. Contudo, pressupõe-se que esse procedimento não interferiu no rendimento dessa amostra, já que se mostrou ligeiramente maior do que as outras, como pode ser verificado na Tabela 6.

Apesar de as médias obtidas não terem sido expressivas, ao se atentar para os valores dos desvios padrão das amostras de arraia, A1, A2 e A3, na Tabela 6, observa-se que a dispersão de cada rendimento em relação à média é menor do que a dispersão dos rendimentos encontrados na literatura,¹⁴⁻¹⁶ massas seca e úmida de ASC. Portanto, verifica-se que esses dados podem apontar para repetitividade do método utilizado neste estudo para o isolamento do ASC. Para as amostras de cação, C1, C2 e C3, essa dispersão foi menor para a massa úmida.

Chi et al¹⁴ fizeram a extração do ASC das cartilagens de Tubarão-martelo (*Sphyrna lewini*), Arraia-vermelha (*Dasyatis akajei*) e Patim (*Raja porosa*), e obtiveram os respectivos rendimentos $5,64 \pm 0,41\%$, $8,72 \pm 0,31\%$ e $6,74 \pm 0,28\%$ (baseados na massa úmida da cartilagem). Segundo os autores, as diferenças no rendimento dessa extração podem ser atribuídas à desigualdade das espécies, estrutura do tecido e preparação do método.

Para o ASC extraído da pele de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) por Kittiphattanabawon e colaboradores,¹⁵ o rendimento obtido foi 9,38% (com referência na massa úmida). Conforme os pesquisadores, esse resultado está associado à solubilização incompleta do colágeno da pele de tubarão em ácido acético $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. A molécula de colágeno nesse tipo de tecido é mais suscetível às ligações cruzadas, que são mediadas por ligações covalentes devido à condensação de grupos aldeído na região do telopeptídeo. Também, as ligações cruzadas inter-moleculares podem diminuir a solubilidade do colágeno na solução ácida que foi utilizada para extração.

Os rendimentos obtidos das cartilagens de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) e Tubarão-galha-preta (*Carcharhinus limbatus*) foram respectivamente, $1,27 \pm 0,24\%$ e $1,04 \pm 0,11\%$ (com base na massa seca), e 0,42% e 0,31% (massa úmida).¹⁶ Ao comparar esses resultados com os obtidos de outros peixes, os autores relacionaram esses baixos valores com a dificuldade de extração do colágeno a partir das cartilagens de ambas espécies do que da pele de peixes, porque o mesmo pode ser apresentado sob a forma complexa. A cartilagem de tubarão pode conter inúmeras ligações cruzadas inter-moleculares na região do telopeptídeo, que é mais provável a solubilização do mesmo por digestão com pepsina e assim, implicando em um maior teor de colágeno.

Atentando-se para esse último parágrafo, observa-se que a média dos rendimentos das amostras A1, A2 e A3 é maior do que as médias encontradas nos rendimentos do ASC do Tubarões bambu e galha-preta. Ressalta-se, ainda, que a média das amostras C1, C2 e C3 também é maior do que as médias calculadas com base na massa úmida dos referidos peixes.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ASC

As seções a seguir apresentam as técnicas que foram aplicadas para a caracterização do ASC. O uso de técnicas complementares foi imprescindível para se obter informações mais conclusivas referentes à sua estrutura, composição e propriedades físico-químicas, tais como estabilidade térmica e perda de massa em função da temperatura.

3.2.1 Técnicas Espectroscópicas

As técnicas espectroscópicas nas regiões do espectro eletromagnético correspondentes ao Ultravioleta-Visível (UV-Vis) e Infravermelho (IR) têm como base a interação da matéria com um fóton. Este último, por apresentar uma frequência definida, faz com que a matéria “responda” a este estímulo de maneira bem característica. Na espectroscopia UV-Vis, esta resposta se dá por meio de transições eletrônicas na faixa de 200-400 nm do ultravioleta e 400-800 nm do visível. Enquanto que na espectroscopia IR, promovida por fótons com comprimento de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} , esta resposta se dá por transições vibracionais.⁵³

A técnica UV-Vis tem apresentado importantes aplicações no controle de processos, entretanto, as suas desvantagens relacionadas à seletividade espectral, e associação de bandas podem ser contornados com o emprego da técnica de infravermelho, na qual os espectros obtidos são mais representativos.⁵⁴

As vantagens da técnica IR com transformada de Fourier são varredura rápida das medidas espectrais, alta precisão e reduzida, ou nenhuma preparação da amostra. A utilização do acessório ATR (Reflexão Total Atenuada), cristal transparente, é vantajoso devido a capacidade de medir amostras líquidas e sólidas sem a necessidade de esmagamento ou diluição durante a preparação.⁵⁴

3.2.1.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Ultra Violeta-Visível (UV-Vis)

Os polipeptídeos absorvem fortemente energia entre 200-400 nm do espectro de UV-Vis. Por isso, a espectroscopia de absorbância a 280 nm pode ser aplicada para acompanhar a purificação de uma proteína com cadeias laterais aromáticas dos aminoácidos fenilalanina (Phe), triptofano (Trp) e tirosina (Tyr). Estes têm alto coeficiente de absorção molar (ϵ) nessa região do espectro.³⁶

Nos artigos de referência,^{14-16,37} esses resíduos de aminoácido aparecem em baixas quantidades na análise de composição de aminoácidos do ASC da cartilagem de elasmobrânquios. Supostamente, o triptofano não compõe esse tipo de tecido, uma vez que o mesmo não aparece na tabela de resultados desses artigos.

De acordo com a literatura científica, os grupos substituintes dos compostos aromáticos, carboxilatos, aminas primária e secundária absorvem entre $230 < \lambda_{\text{máx}} < 280$ nm.⁵³

Zhang e colaboradores⁴⁶ obtiveram uma absorção a 233 nm e nenhuma a 280 nm para o ASC isolado da pele de Peixe-gato (*Mystus macropterus*). De um modo geral, segundo esses pesquisadores, o $\lambda_{\text{máx}}$ de proteínas, no UV-Vis, é 280 nm.

Para o ASC extraído da pele de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*), por Kittiphattanabawon e colaboradores,¹⁵ foi encontrada apenas uma absorção a 230 nm. De acordo com seus relatos, nenhum pico a 280 nm é indicativo para uma elevada eficácia da remoção de proteínas não-colágenas, pois o colágeno, geralmente, tem uma baixa quantidade de tirosina que poderia apresentar uma absorbância na região de 280 nm do UV-Vis.

Duan e colaboradores⁵⁵ observaram só uma absorbância a 223 nm para o ASC a partir da pele, escama e osso de Carpa (*Cyprinus carpio*). Este pico, relataram os mesmos, é característico do colágeno em tripla hélice.

Nas Figuras 21, 22 e 23, são apresentados os espectros UV-Vis do ASC das amostras A e C, obtidas neste trabalho de dissertação. Após análise dos mesmos, observou-se que as absorbâncias das amostras AA-A3 e C1-C3 não apresentaram

diferenças significativas, cujos valores foram 230 nm e 273 nm, e 230 e 271 nm, respectivamente. Essa certa similaridade pode ser melhor observada nos espectros de A3 e C3.

Na interpretação desses espectros, não se observou nenhuma absorbância a 280 nm, que está relacionada à baixa quantidade de tirosina na molécula de colágeno e que poderia absorver energia nesse comprimento de onda do espectro de UV-Vis, o que apontaria para a ineficácia do tratamento alcalino.^{15,55} Esse resultado está em conformidade com os obtidos pelos pesquisadores, supracitados. Portanto, presume-se que o processo de desproteinização das cartilagens foi bem sucedido.

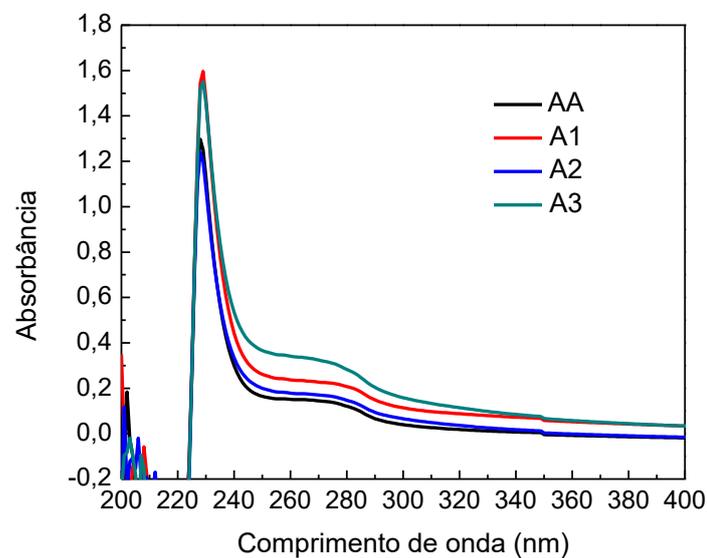


Figura 21. Espectros UV-Vis das amostras AA, A1, A2 e A3 de ASC.

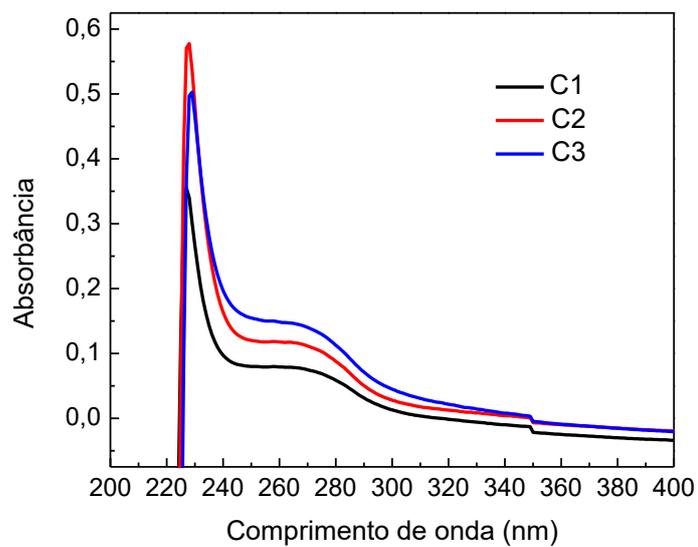


Figura 22. Espectros UV-Vis das amostras C1, C2 e C3 de ASC.

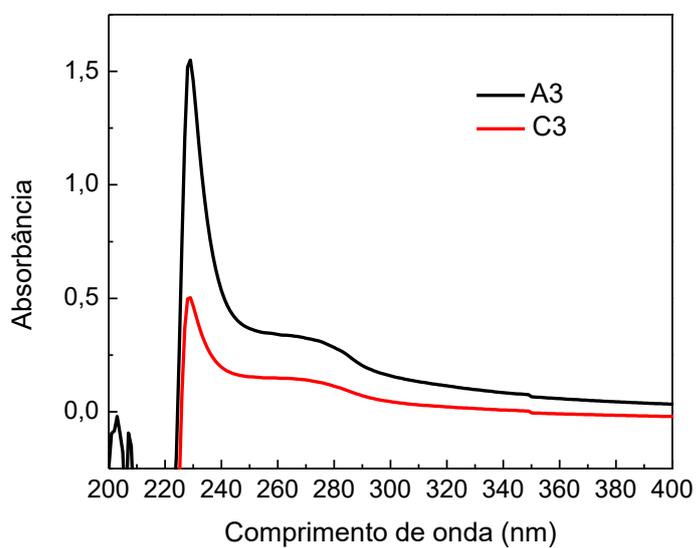


Figura 23. Espectros UV-Vis das amostras A3 e C3 de ASC.

3.2.1.2 Espectroscopia Vibracional de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é utilizada principalmente para se obter informações sobre os grupos funcionais presentes na estrutura de uma molécula. A interpretação de seus espectros, na região entre 4000 e 1100 cm^{-1} , é fundamentada nos possíveis modos vibracionais de estiramento (ν) e deformação (δ) de ligações C-C, C-H, C-O, C=O, N-H, O-H e outras que possam identificar grupos funcionais.^{53,56}

Os espectros FTIR das amostras A e C de ASC estão apresentados nas Figuras 24, 25 e 26. Para efeito de identificação de grupos funcionais presentes na estrutura do ASC, considerou-se as principais bandas nos referidos espectros, vide Tabela 7.

Usualmente, a análise de amostras protéicas por FTIR costuma observar as seguintes regiões características da presença do grupo funcional amida: amida I = 1651 e 1649 cm^{-1} ; amida II = 1553 e 1552 cm^{-1} ; amida III = 1239 e 1239 cm^{-1} + 1456 e 1455 cm^{-1} ; amida A = 3313 e 3313 cm^{-1} ; amida B = 2981 e 2980 cm^{-1} . Os espectros das amostras A e C apresentaram as absorções esperadas, além de picos em 2359 cm^{-1} atribuídos a CO_2 .

Tabela 7. Principais absorções do espectro de FTIR das amostras A e C de ASC, grupos funcionais e modos vibracionais das ligações.

Nº de ondas (cm^{-1})	Grupo funcional e modos vibracionais das ligações (estiramento, ν e deformação, δ)
3313 e 3313	Amida A ($\nu\text{N-H}$)
2981 e 2980	Amida B ($\nu\text{C-H}$)
1649 e 1651	Amida I ($\nu\text{N-H}$ e $\nu\text{C=O}$ /ligação H acoplada ao COO^-)
1553 e 1552	Amida II ($\delta\text{N-H}$ e $\nu\text{C-H}$)
1239 e 1239	Amida III ($\nu\text{C-N}$ e $\delta\text{N-H}$)
1456 e 1455	Amida III ($\nu\text{C-N}$, $\delta\text{N-H}$ e $\delta\text{C-H}$ da banda CH_2 da glicina e do anel pirrolidínico)
1085 e 1082	

A região da amida I é utilizada especialmente para a análise da estrutura secundária das proteínas.³⁷ Nessa região, apareceu uma banda de forte intensidade a 1651 e 1649 cm^{-1} , correspondente às vibrações de estiramento C=O (1600-1700 cm^{-1}) de grupo carboxílico, realizando ligação hidrogênio com os grupos N-H de ligações peptídicas de cadeias próximas.¹⁴ Estas dão estabilidade à estrutura secundária (tripla α -hélice) da molécula de colágeno. A referida banda é associada, principalmente, à presença de vibração do estiramento C=O acoplada com as vibrações de estiramento N-H, estiramento C-N e deformação C-C-N, ou vibração de ligação hidrogênio acoplada com COO^- nas ligações peptídicas.^{15,16,45}

Esses valores apontam que, durante o processo de pesca, beneficiamento da carne, distribuição para o mercado, exposição, compra e posterior extração, não houve desnaturação significativa da molécula de ASC, ou seja, a sua estrutura secundária foi preservada.^{15,16}

Na região da amida II, notou-se uma banda de média intensidade, na faixa 1553 e 1552 cm^{-1} , a qual está associada à estrutura de tripla hélice do colágeno.³⁷ Essa banda resulta da vibração de deformação N-H no plano, acoplada com vibração de estiramento C-N. A intensidade da mesma está relacionada à estrutura helicoidal de tripla hélice.^{15,37} Valores mais baixos que 1550-1600 cm^{-1} são característicos de ligação hidrogênio, dessa forma, A e C apresentaram conformidade em sua estrutura secundária.^{14,55}

As bandas de fraca intensidade estão na região da amida III, absorções em 1239 cm^{-1} , também, 1456 e 1455 cm^{-1} , representam as vibrações de estiramento C-N, acoplada com deformações N-H de ligações amídicas e C-H do grupo CH_2 da estrutura da glicina e das cadeias laterais da prolina. E ainda, absorções em 1085 e 1082 cm^{-1} das vibrações de estiramento C-O.^{14,37,45} Essas bandas de A e C, revelaram que a estrutura tripla helicoidal do ASC não foi afetada, ou seja, desnaturada. Isto pôde ser confirmado a partir da razão entre índices de absorção da amida III, 1239 cm^{-1} /1455 cm^{-1} , cujos valores foram ~ 1 .^{14-16,55}

Algumas bandas largas de fraca intensidade foram verificadas em 3313 cm^{-1} , região das amidas A, que apresentam vibrações de estiramento simétrico N-H

acoplada com ligação hidrogênio em $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$. Também, verificou-se bandas de fraca intensidade a 2981 e 2980 cm^{-1} , característico da região da amida B cujo estiramento assimétrico CH_2 ocorre em $\sim 2962\text{ cm}^{-1}$. A vibração de estiramento assimétrico de N-H livre ocorre na região entre 3400 e 3440 cm^{-1} , mas pode ser deslocada para uma de baixa frequência, geralmente 3300 cm^{-1} , quando o grupo NH de um peptídeo está envolvido em uma ligação hidrogênio.^{14-16,55}

Com base nos resultados apresentados na literatura,^{14-16,37,55} e nas análises individuais dos espectros de A e C, Figuras 24 e 25 respectivamente, assim como, dos espectros de ambas as amostras na Figura 26, identificou-se a presença de grupos funcionais característicos de polipeptídeos. Os valores encontrados dos números de onda das amidas I, II e III estão diretamente associados à configuração do ASC.¹⁴

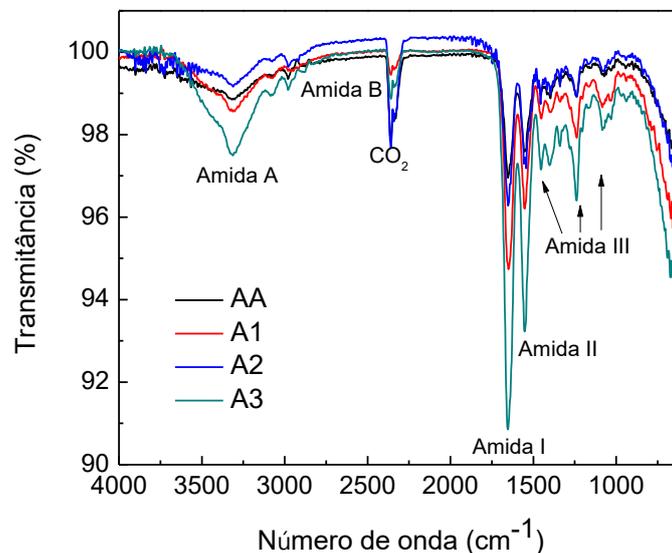


Figura 24. Espectros FTIR das amostras AA, A1, A2 e A3 de ASC.

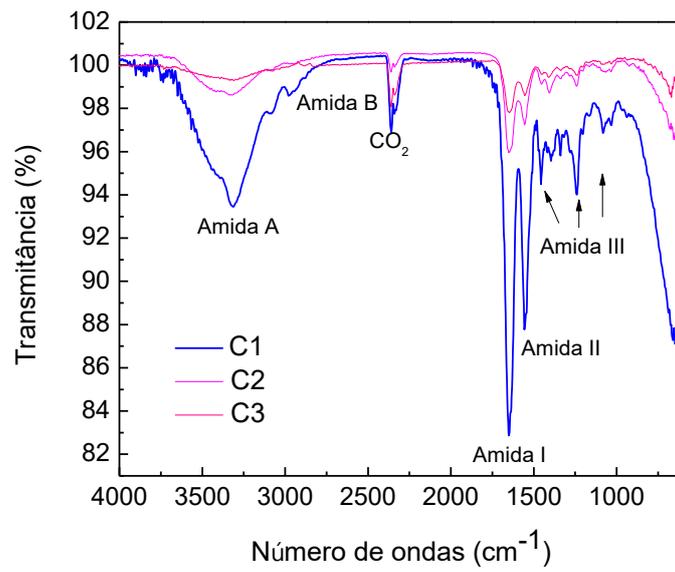


Figura 25. Espectros FTIR das amostras C1, C2 e C3 de ASC.

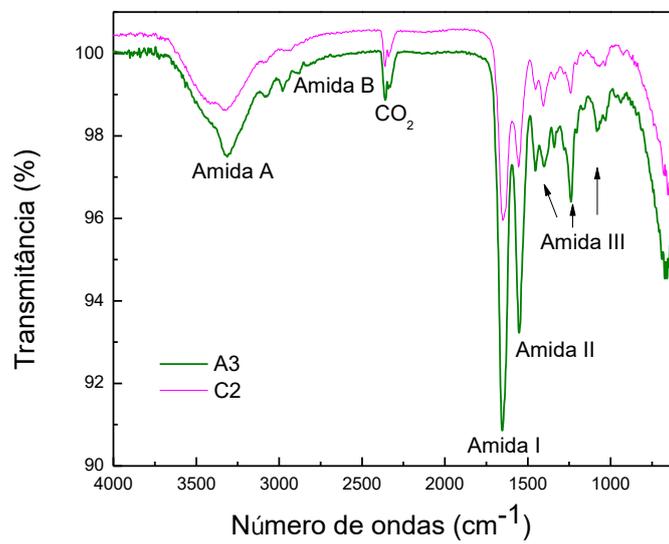


Figura 26. Espectros FTIR das amostras A3 e C3 de ASC.

3.2.2 Análises Térmicas

As técnicas de análises térmicas TG/DTG e DSC foram aplicadas neste estudo para complementar a caracterização do ASC, nas quais suas propriedades térmicas de estabilidade, degradação, decomposição, oxidação e transição foram investigadas em função da temperatura e tempo.

As técnicas termoanalíticas constituem um conjunto de técnicas que medem a variação de uma determinada propriedade física de uma amostra em função da temperatura ou tempo, enquanto a mesma é submetida a uma programação controlada de temperatura.^{57,58}

Dentre essas técnicas, TG/DTG e DSC têm sido empregadas em várias áreas de pesquisa para diferentes aplicações práticas, por exemplo, caracterização de diversos materiais. Cada uma com a habilidade de acompanhar uma propriedade física específica.^{57,58}

A Termogravimetria (TG) é uma técnica de análise térmica utilizada para medir as variações de massa da amostra em função da temperatura, e/ou tempo (com a temperatura constante). Durante o aquecimento podem ser verificadas perdas de massa atribuídas à desidratação ou decomposição da amostra, entre outros eventos. A DTG corresponde à derivada primeira da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) ou temperatura (dm/dT), as curvas são registradas a partir das curvas TG.⁵⁸

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica que mede a energia envolvida nos eventos térmicos associada às transições termodinâmicas da amostra em função da temperatura ou tempo. A capacidade calorífica e mudança de fase são eventos térmicos observados durante a medida de variação de entalpia da amostra, entre outros. A variação de entalpia (ΔH) é dada pela diferença entre a temperatura da amostra (T_a) e a temperatura da referência (T_r).^{57,58}

3.2.2.1 Termogravimetria (TG)/Termogravimetria Derivada (DTG)

As curvas TG/DTG das amostras AA, A1 e C1 de ASC são mostradas nas respectivas Figuras 27, 28 e 29. Nestas, observar-se picos durante o decaimento de massa desse material em cada evento térmico (desidratação, degradação, decomposição e carbonização). Por meio da análise dessas curvas, constatou-se que AA e A1 apresentaram 4 estágios, enquanto os eventos de C1 parecem ter 3 ou 4 estágios, provavelmente, 2 destes ocorreram de modo simultâneo.

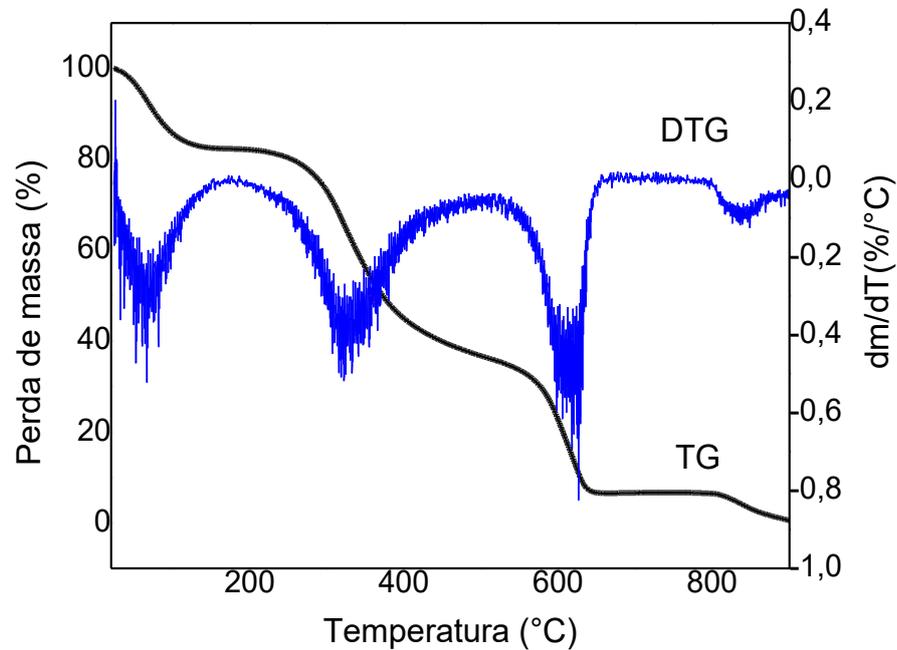


Figura 27. Curvas TG/DTG da amostra AA de ASC.

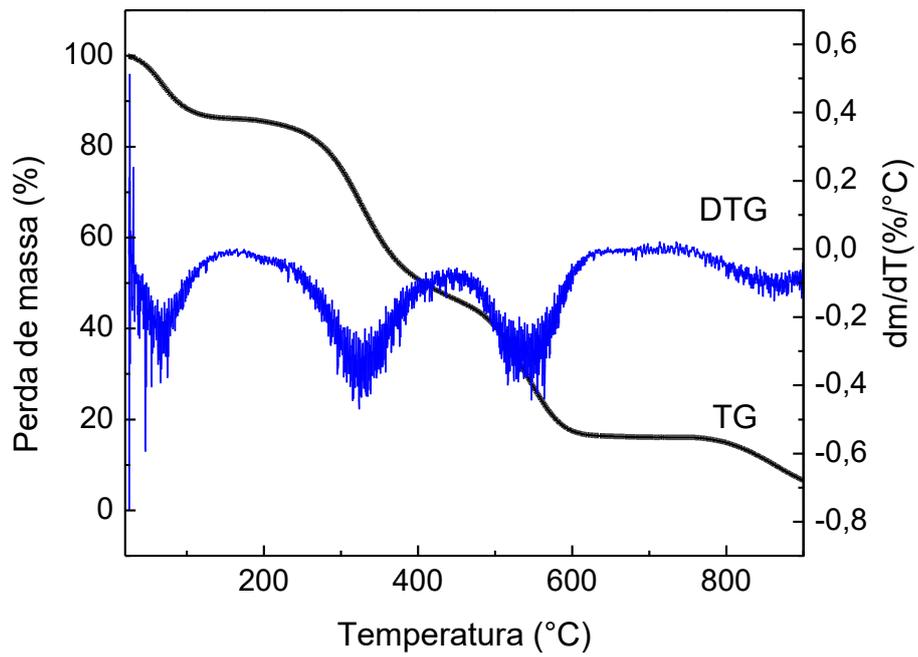


Figura 28. Curvas TG/DTG da amostra A1 de ASC.

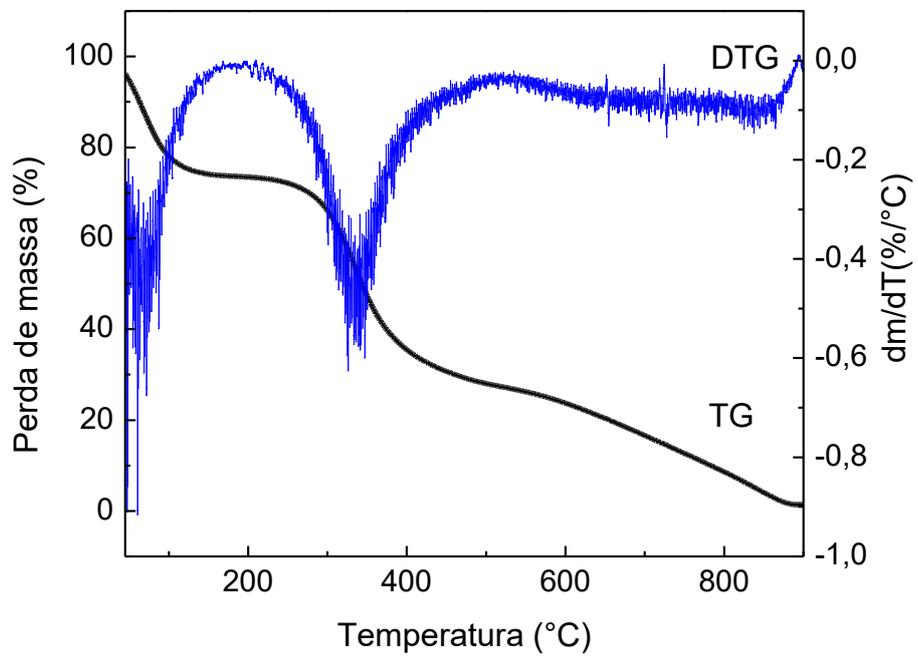


Figura 29. Curvas TG/DTG da amostra C1 de ASC.

A curva TG/DTG de AA apresentou a perda de massa em 4 estágios: primeiro, entre 69 e 325 °C, atribuído à desidratação da molécula de colágeno; segundo e terceiro, entre 325 a 600 °C, relacionados às respectivas degradação parcial da cadeia polipeptídica pela quebra de ligações fracas, dipolo-dipolo entre heteroátomos C-OH e C-N (43% em massa), e degradação total da cadeia polipeptídica pelo rompimento de ligações covalentes entre átomos de carbono C-C (29% em massa); quarto, acima de 600 °C, carbonização da matéria orgânica (6% em massa).^{44,59}

Na curva TG/DTG de A1, também observou-se 4 estágios: primeiro, desidratação da molécula de colágeno ocorrida entre 57 e 220 °C; segundo, entre 220 a 397 °C, degradação parcial da cadeia polipeptídica pela quebra de ligações fracas C-OH e C-N (29% em massa); terceiro, entre 397 e 600 °C, degradação total da cadeia polipeptídica pelo rompimento de ligações C-C (37% em massa); quarto, carbonização da matéria orgânica (9% em massa) acima de 600 °C.^{44,59}

A curva TG/DTG de C1 apresentou, aparentemente, 3 estágios. Talvez, tenha sido 4, sendo 2 simultâneos como em AA, entretanto, na curva TG desta amostra os ficaram mais evidenciados do que em C1: primeiro, entre 32 e 266 °C, desidratação da molécula; segundo e terceiro, entre 266 a 538 °C, relacionados às respectivas degradação parcial da cadeia polipeptídica pela quebra de ligações C-OH e C-N, e degradação total da cadeia polipeptídica pelo rompimento de ligações C-C (43% em massa); quarto, carbonização da matéria orgânica (28%, em massa) acima de 538 °C.^{44,59}

Dentre os eventos observados, as três amostras apresentaram maiores percentuais de perda de matéria orgânica (AA, 72%; A1, 66% e C1, 43%, respectivamente) em relação aos seus respectivos percentuais de perda de cinzas, 6%, 9% e 28%. Das três amostras, nota-se que C1 apresentou o maior percentual de perda de cinzas, entretanto, menor de matéria orgânica.

Em relação ao comportamento térmico das amostras, diante da taxa de aquecimento que foram submetidas, AA e A1 mostraram-se semelhantes quanto aos números de estágios, ao passo que C1 parece ter exibido dois eventos em um único

estágio, como pode se observar na Tabela 8 e Figuras 27, 28 e 29. As curvas TG/DTG das amostras A2 e A3 estão apresentados no anexo.

Tabela 8. Eventos de cada estágio das curvas TG/DTG das amostras AA, A1 e C1 de ASC.

Amostra AA				
Estágio	1°	2°	3°	4°
Temperatura (°C)	(69-325)	(325-600)	(325-600)	(>600)
Perda de massa (%)	—	43	29	6
Eventos	Perda de água	Degradação	Degradação	Carbonização
Amostra A1				
Estágio	1°	2°	3°	4°
Temperatura (°C)	(57-220)	(220-397)	(397-600)	(>600)
Perda de massa (%)	—	29	37	9
Eventos	Perda de água	Degradação	Degradação	Carbonização
Amostra C1				
Estágio	1°	2°	3°	4°
Temperatura (°C)	(32-266)	(266-538)	(226-538)	(>538)
Perda de massa (%)	—	43	43	28
Eventos	Perda de água	Degradação	Degradação	Carbonização

Nos estudos realizados por Tonhi⁵⁹ para a obtenção e caracterização de blendas de colágeno-quitosana, a curva TG/DTG da perda de massa do colágeno de mamífero, extraído serosa suína, apresentou 2 estágios: primeiro, perda de água (14,5% em massa) na faixa de 25-200 °C; segundo, degradação polimérica (61,8% em massa) de 200-500 °C; quantidade de resíduo (21,2% em massa) à 600 °C.

Na literatura, o resultado da análise centesimal (imediate ou elementar) para o ASC de elasmobrânquios apontou certa similaridade em sua composição, que teve o maior percentual no teor de matéria orgânica (proteínas e lipídeos) e variações do mesmo, nos teores de cinzas e umidade. Por exemplo: cartilagens de Tubarão-martelo, Arraia-vermella e Patim foram respectivamente 94,96, 80,69 e 91,04% de

matéria orgânica, 4,58, 14,60 e 7,66% de cinzas, e 0,50, 4,86 e 0,85% de umidade (também, o colágeno de pele de mamífero, bezerro, teve os seus percentuais de matéria orgânica, cinzas e umidade apresentados, respectivamente 87,30, 8,18, e 4,62%);¹⁴ peles de Patim mostraram 86,75% de matéria orgânica, 3,38% de cinzas, e 7,01% de umidade.⁵⁰ Por fim, a cartilagem de Tubarão-prata, entretanto, apresentou baixo percentual de matéria orgânica, 10,64%, ao passo que o de umidade foi alto, 63,56%, e de cinzas foi 25,41%.³⁷

Portanto, pode-se concluir que os resultados deste trabalho estão em conformidade com os apresentados nos artigos de referência, acima, para os maiores teores de proteínas, obtidos por análise centesimal.

3.2.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A estabilidade térmica da amostra A2 de ASC pôde ser analisada em termograma de DSC. Esta análise gerou uma curva de transição térmica na qual a temperatura máxima de transição do ASC foi em 40 °C e uma entalpia total de desnaturação (ΔH) de 0,23 J g⁻¹, como podem ser vistas na Figura 30.

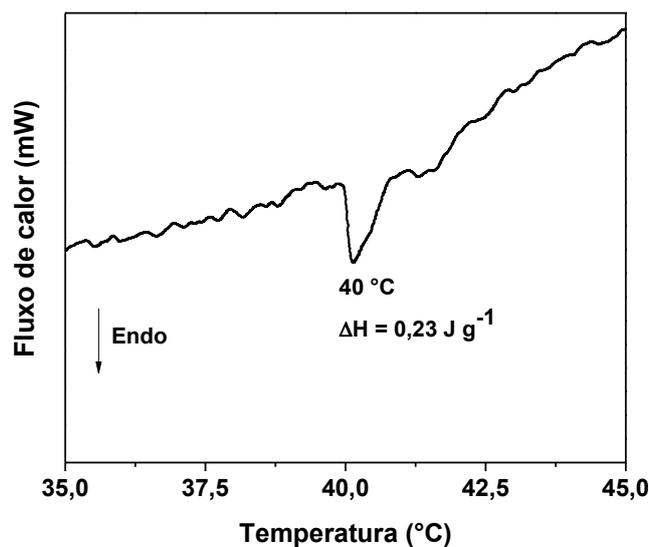


Figura 30. Curva DSC da amostra A2 de ASC apresentando um pico endotérmico na temperatura de desnaturação (T_d) e variação de entalpia (ΔH).

O evento observado em A2, corresponde a temperatura de desnaturação (Td) de ASC, cujo valor aponta que não houve alteração em sua estrutura de tripla hélice, o que levaria à perda de suas características.^{15,16,37}

A desnaturação térmica representa o desdobramento da tripla hélice para uma conformação aleatória. Isto faz com que o colágeno perca as suas características únicas.³⁷

O resultado do processo de transição térmica de A2 mostrou que a quantidade de calor, ou seja, a entalpia total de desnaturação foi menor do que as apresentadas para o ASC das cartilagens de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) e Tubarão-galha-preta (*Carcharhinus limbatus*),¹⁶ respectivamente 1,55 e 0,70 J g⁻¹; e da pele de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*),¹⁵ 0,66 J g⁻¹. Isto indica que A2 absorveu menos calor que essas espécies.

Apresenta-se a seguir, as diferentes Tds do ASC as quais estão na ordem de suas respectivas espécies: 36,7 e 36,3 °C das cartilagens do Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) e Tubarão-galha-preta (*Carcharhinus limbatus*);¹⁶ 23,8, 15,1 e 12,1 °C das cartilagens de Tubarão-martelo (*Sphyrna lewini*, ASC-S), Arraia-vermelha (*Dasyatis akajei*, ASC-D) e Patim (*Raja porosa*, ASC-R);¹⁴ 34,5 °C da pele de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*);¹⁵ 30,0 °C do ASC (Tipo II) da cartilagem do Tubarão-prateado (*Carcharhinus albimarginatus*);³⁷ e 28,8 °C da pele da arraia (*Raja Kenojei*);⁶⁰

O resultado aponta que a Td do ASC obtida para A2, *Rajidae spp*, é bem próxima dos valores das Tds de algumas dessas espécies. A saber, do ASC da pele e das cartilagens de Tubarão-bambu e das cartilagens de Tubarão-galha-preta, porém, bem maior que as Tds do ASC da *Raja porosa* e *Raja Kenojei*, embora sejam da mesma família *Rajidae*. Entretanto, o valor da primeira se mostrou bem próximo ao que foi exibido para *Dasyatis akajei*, da família *Dasyatidae*. Enquanto, que os valores das diferentes espécies de tubarão mostraram-se bem próximos, mesmo que o ASC tenha sido obtido de pele ou cartilagem.

A Td do colágeno pode ser afetada pelo grau de hidroxilação da sequência Gly-Pro-Hyp.³⁷ Portanto, é bem provável que essas diferenças sejam inerentes ao gene

de cada animal, no que se refere à constituição de sua cadeia primária.¹⁶ De acordo com a literatura, já foram identificadas ~25 cadeias α de colágenos diferentes, cada uma codificada por um gene específico. As diversas associações desses genes podem ser expressas em diferentes tecidos. E, a composição destes varia com a espécie.³⁴

O resultado aponta que o tratamento alcalino, provavelmente, não afetou a estrutura terciária do A2, já que o mesmo apresentou uma certa resistência ao calor de desnaturação como atesta a sua Td. Isto implica em dizer, que a sua estabilidade térmica foi maior do que a das espécies supracitadas. Segundo Kittiphattanabawon e colaboradores,¹⁶ uma maior quantidade de ácido imino presente no colágeno de peixe, implica em um aumento da sua temperatura de desnaturação.

A Td está diretamente relacionada a estabilidade térmica da molécula de colágeno. Sendo essa característica, fator determinante para a aplicabilidade do ASC nas áreas de biofármacos, biomédicas e de alimentos, principalmente como estabilizante.^{14,16} Tds acima de 50 °C levam à desnaturação da molécula de ASC pela quebra das ligações hidrogênio, que são responsáveis pela sua estrutura de tripla hélice.⁵⁰

Nos colágenos de peixes, a desnaturação a baixa temperatura pode ser diretamente associada ao baixo grau de hidroxilação de prolina.⁶⁰ O desenrolamento aleatório da molécula conduz a uma perda de suas características, tais como viscosidade, solubilidade, turbidez, consistência entre outras. Sendo a viscosidade o principal fator que afeta as propriedades físico-químicas e funcionais do colágeno.^{37,50}

Para as demais amostras A e C não observou-se nenhum pico endotérmico ou exotérmico na faixa de temperatura avaliada. Supostamente, a transição térmica não observada nessas amostras pode ser atribuída à sua baixa concentração de colágeno em relação ao nível de hidratação. Portanto, a quantidade da amostra no material deve ter influenciado em sua capacidade térmica. Segundo Bernal e colaboradores,⁵⁷ uma curva típica de DSC apresenta picos endotérmico ou exotérmico e a forma da mesma pode ser afetada por fatores instrumentais e por características da amostra, dada a temperatura dinâmica da técnica.

3.2.3 Eletroforese SDS-PAGE

Na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, as cadeias polipeptídicas individuais formam um complexo com moléculas aniônicas do dodecil sulfato de sódio (SDS) e migram como um complexo SDS-proteína, de carga negativa, através de um gel poroso de poliacrilamida. Quanto menor for o polipeptídeo, maior será a sua velocidade de migração no gel. Baseando-se nisto, a eletroforese pode ser utilizada para determinar a massa molecular aproximada de uma cadeia polipeptídica, assim como a composição das subunidades de uma proteína.³⁴

A eletroforese de proteína geralmente ocorre em géis de agarose ou poliacrilamida com um tamanho de poros característicos, nos quais a separação das moléculas é baseada em seu tamanho, forma e mobilidade eletroforética, isto é, carga elétrica.³⁶

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitiu estimar a massa molecular (MM) e a composição das subunidades do ASC. Isto foi possível por meio de comparação de sua mobilidade com a do marcador de massa molecular conhecida (padrão de alta MM). O gel SDS-PAGE revelou a presença de várias bandas proteicas, cujas MM variavam de ~300-100 kDa. O padrão SDS-PAGE pode ser visto na Figura 31, a qual exhibe as amostras na respectiva ordem: M (padrão), AA, A1, A2, A3, C1, C2 e C3.

- Gel SDS-PAGE

- Stacking 4%/Separating 7,5%
- 15 μ amostra + 5 μ tampão de amostra
- Corrida: 20 mA, 100-130 V, 1 h 10min



Amostras

- 1 mg diluído em 0,2 mL de solução de SDS 5%
- Aquecidas a 85 °C, 1 h

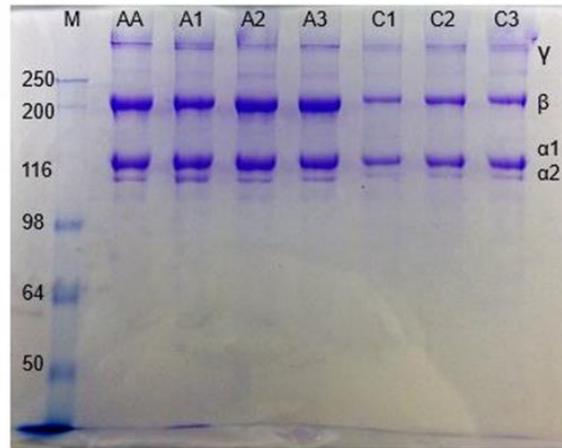


Figure 31. Padrão SDS-PAGE das amostras AA-A3 e C1-C3 de ASC.

Após corrida do gel, verificou-se o mesmo padrão de cortes, ou melhor, eletroforético para as sete amostras de ASC. Entretanto, as amostras C exibiram bandas menos intensas e de menor mobilidade em relação a A. Todas continham MM ~300 kDa separadas em três frações diferentes: duas cadeias α de ~116-100 kDa apresentando bandas distintas (α 1, de forte intensidade e α 2, fraca intensidade), uma cadeia β (dímeros, duas cadeias α interligadas covalentemente) atribuída a ~200-180 kDa e uma cadeia γ (trímeros, três cadeias α associadas por ligações covalentes), correspondente a ~300-250 kDa, a qual se assemelha ao valor da MM do colágeno, cuja unidade estrutural básica de super-hélice, tropocolágeno, tem MM \approx 300 kDa.^{14,40,46}

As intensidades das bandas das cadeias α 1, α 2, β e γ mostraram-se distintas. As subunidades α 1 e β são os principais componentes do colágeno, e a cadeia γ mostrou-se bem menos intensas entre as três. A cadeia α 1 foi aproximadamente duas vezes maior que α 2, cuja banda de fraca intensidade apareceu em todas as amostras A e C. Segundo Kittiphattanabowin e colaboradores,¹⁵ a maior intensidade de α 1 em relação a α 2 sugere a presença de colágeno do tipo I.

Os resultados se encontram em conformidade com os do colágeno do tipo I obtidos a partir de cartilagens de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*) e Tubarão-galha-preta (*Carcharhinus limbatus*);¹⁶ cartilagens de Tubarão-martelo (*Sphyrna lewini*, ASC-S), Arraia-vermelha (*Dasyatis akajei*, ASC-D) e Patim (*Raja porosa*, ASC-R);¹⁴ pele de Tubarão-bambu (*Chiloscyllium punctatum*);¹⁵ pele de Peixe-gato (*Mystus macropterus*);⁴⁶ pele de arraia (*Raja kenojei*);⁶⁰ e pele de Carpacapim (*Ctenopharyngodon idella*).⁶¹ Ainda, filmes de gelatina obtidos a partir da pele de Tubarão-azul (*Prionace glauca*).⁶²

No que se refere ao tipo de colágeno encontrado no padrão SDS-PAGE, Chi e colaboradores,¹⁴ assim como, Kittiphattanabawon e equipe¹⁶ propuseram em seus resultados que, além do colágeno tipo I, $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$, pode haver a presença do tipo II, $[\alpha 1(II)]_3$, no ASC obtido das cartilagens das espécies utilizadas, parágrafo anterior.

Logo, quando se comparou os padrões eletroforéticos desses pesquisadores com o padrão de Jeevithan e colaboradores,³⁷ para o colágeno tipo II da pele de Tubarão-prateado (*Carcharhinus albimarginatus*), assim como, com o padrão de Hwang e colaboradores⁶⁰ para colágeno tipo II da cartilagem de arraia (*Raja kenojei*), notou-se algumas semelhanças muito sutis em seus padrões de corte na altura das cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$, MM ~250-116 kDa.

Com base na mobilidade eletroforética, na composição das subunidade $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e nos relatos da literatura, pode-se inferir que as amostras A e C do ASC foram bem semelhantes e, supostamente, são constituídas majoritariamente por colágeno do tipo I. Talvez, as bandas α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$, MM ~116-100 kDa) das amostras A2, A3 e C2 possam ter alguma associação com a presença de colágeno do tipo II, como concluiu Chi e colaboradores.¹⁴ Ressalta-se que as células condrócitos, características da matriz cartilaginosa, podem parar de produzir colágeno do tipo II na cartilagem e passam a produzir o do tipo I, quando se transformam em células fibroblastos devido aos efeitos físico-químicos sofridos pela matriz extracelular.³⁴

3.2.4 Mapeamento de Peptídeos

O mapa peptídico de ASC pode ser visto na Figura 32, onde as amostras estão nesta ordem: M (padrão), AA, A1, A2, A3, C1, C2 e C3.

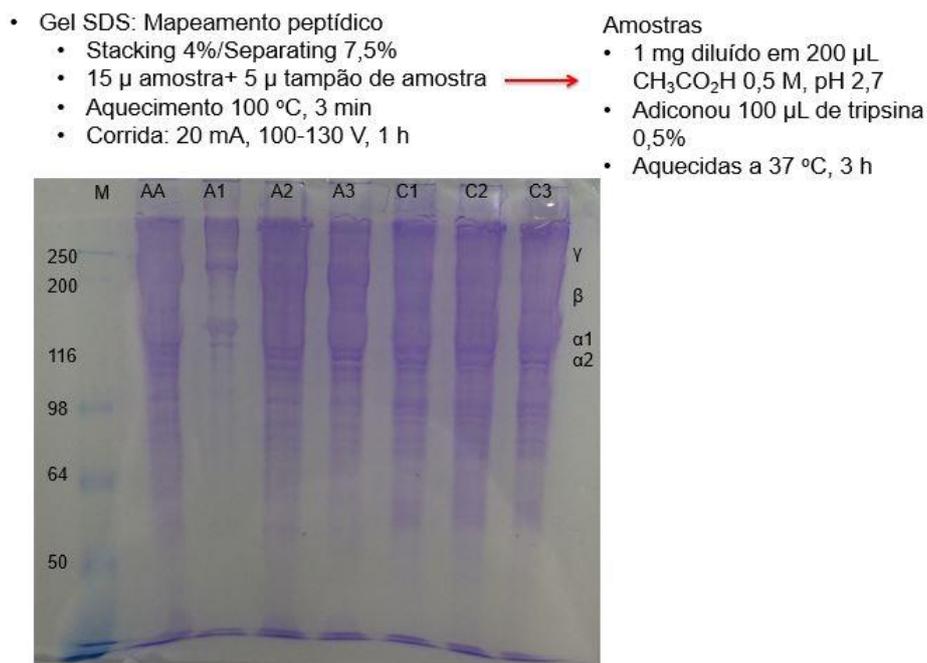


Figure 32. Mapa peptídico das amostras AA-A3 e C1-C3 de ASC.

As amostras de ASC foram digeridas com tripsina. Após a hidrólise enzimática, suas cadeias polipeptídicas α , β e γ foram reduzidas a peptídeos de MM abaixo de ~116 kDa. Isto pôde ser concluído com base no padrão M de alta massa molecular (1ª pista à esquerda da Figura 32) e na análise do mapa peptídico de ASC.

Em todas as amostras, exceto A1, observou-se um certo padrão na hidrólise de suas subunidades polipeptídicas α , β e γ (MM ~116-100, 200-180 e 300-250 kDa, respectivamente) que se mostraram suscetíveis à clivagem proteolítica. Essa observação foi possível, devido ao número gerado de seus fragmentos peptídicos com MM menor e à diminuição na intensidade de suas bandas.¹⁴

Provavelmente, A1 foi mais resistente à digestão com tripsina já que reteve mais componentes, ~200-116 kDa, e isso foi evidenciado pela menor quantidade de fragmentos peptídicos gerados e por uma menor intensidade de bandas.

O mapeamento peptídico apontou a presença das cadeias polipeptídicas $\alpha 1$, $\alpha 2$, β e γ para todas as amostras, sugerindo que A e C podem ter a estruturas primárias semelhantes.¹⁴ Logo, baseando-se na composição das subunidades e na mobilidade eletroforética das referidas cadeias de A e C, chegou-se à conclusão que, provavelmente, o colágeno da cartilagem de A e C eram do tipo I. Esses resultados estão de acordo com os apresentados na literatura.^{14-16,46,60,61}

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 CONCLUSÕES

No presente estudo, o colágeno foi isolado e caracterizado em rendimentos compatíveis com os da literatura. A sua obtenção partiu do aproveitamento da biomassa residual pesqueira, especificamente, cartilagens de arraia (*Rajidae spp*) e Cação-azul (*Prionace glauca*).

Após isolamento do ASC pelos processos de centrifugação, diálise e liofilização, a sua caracterização por UV-Vis, FTIR, TG/DTG, DSC, SDS-PAGE e mapeamento peptídico determinou suas propriedades, características físico-químicas e grupos funcionais presentes em sua estrutura, que foram semelhantes às do colágeno do tipo I.

Embora, sejam necessárias mais investigações acerca da otimização dos rendimentos obtidos neste estudo, considera-se que o método empregado mostrou viabilidade econômica e tecnológica para a extração do ASC a partir de cartilagens de elasmobrânquios.

Portanto, pode-se concluir, que os resultados aqui alcançados apontaram para a repetitividade do método utilizado.

Por ser muito versátil, o colágeno apresenta-se em diversas formas e com vasta aplicação nas áreas de biomedicina, bioengenharia de tecidos, biofármacos, cosméticos e alimentos, por isso, tem se destacado no campo científico e biotecnológico.

Devido à biomassa pesqueira estar disponível em vasta quantidade e por não competir com a produção de alimentos, pois é considerada resíduo, pode ser aproveitada como matéria-prima, renovável, biodegradável e de valor agregado para a obtenção do colágeno, podendo assim contribuir para minimização de impactos ambientais e socioeconômicos.

4.2 PERSPECTIVAS

Para dar continuidade a esta pesquisa, de modo a se obter resultados mais conclusivos, sugere-se as seguintes análises complementares:

- Análise centesimal (imediate ou elementar) para determinar os teores de proteínas, lipídeos, umidade e cinzas presentes no ASC;
- Ensaio de Bradford para determinar o teor de proteínas;
- Análise de aminoácidos para determinar a composição de aminoácidos que compõem a cadeia polipeptídica do ASC;
- Quantificação de hidroxiprolina e hidroxilisina, dois aminoácidos raros, presentes em poucas proteínas animais;
- Quantificação de glicosaminoglicanos, muito abundante na matriz cartilaginosa;
- Buscar aplicações para o ASC obtido de cartilagens de elasmobrânquios, visto que, até o momento, grande parte das pesquisas têm se limitado apenas ao seu isolamento e caracterização. Embora, tenha se mostrado promissor quanto à sua disponibilidade, biodegradabilidade, versatilidade e custo. E ainda, mostra-se como uma alternativa às opções de consumo de proteínas bovina e suína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério do Meio Ambiente (MMA); Programa Revizee, Antecedentes <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/item/7598> acessado em setembro 2016.
2. Organização das Nações Unidas (ONU); Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento, Agenda 21; *Câmara dos Deputados, Coord. Publicações, Brasília, 1995, cap. 3, 5, 472.*
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); The State of World Fisheries and Aquaculture, Opportunities and Challenges 2014; *FAO Fish. Aquac. Dep. Rome, 2014, 223.*
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); FAO Statistical Yearbook 2013, World Food and Agriculture; *FAO Fish. Aquac. Dep. Rome, 2013, 1, 289.*
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); The State of World Fisheries and Aquaculture 2012; *FAO Fish. Aquac. Dep. Rome, 2012, 209.*
6. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA); Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010; *Ministério da Pesca e Aquicultura, Bras. 2012, 129.*
7. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA); Proposta de Plano de Gestão para o uso Sustentável de Elasmobrânquios Sobre-explotados ou Ameaçados de Sobre-exploração no Brasil; *Ibama; MMA, Brasília, 2011, 154.*
8. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA); 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura; **2014**, 136.
9. Feltes, M. M. C.; Correia, J. F. G.; Beirão, L. H.; Block, J. M.; Ninow, J. L.; Spiller, V. R. Alternativas para a Agregação de Valor aos Resíduos da Industrialização de Peixe; *Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient. 2010, 14, 669–677.*
10. Mendonça, F. F.; Foresti, F. Tubarões e Raias em Risco e a Expansão das Pesquisas Genéticas para Auxiliar na Conservação; *Assoc. Bras. Biol. Mar. (ABBM); Bol. Inf. da Assoc. Bras. Biol. Mar. 4 vol. 5, nº 1 2012.*
11. Mendonça, F. F.; Foresti, F. Tubarões, Pesquisa Genética Auxilia Conservação; *Ciência Hoje, 2011, 48, 49–52.*
12. Nações Unidas no Brasil (ONUBR); Habitantes

<https://nacoesunidas.org/cidades-terao-mais-de-6-bilhoes-de-habitantes-em-2050-destaca-novo-relatorio-da-onu/> acessado em setembro 2016 (accessed Jun 20, 2009).

13. Instituto Brasileiro do; Renováveis, A. e dos R. N. (IBAMA); Desembarque de Pescado no Rio Grande do Sul 2011; **2012**, 40 p.
14. Chi, C. F.; Wang, B.; Li, Z. R.; Luo, H. Y.; Ding, G. F. Characterization of Acid-soluble Collagens from the Cartilages of Scalloped Hammerhead (*Sphyrna lewini*), Red Stingray (*Dasyatis akajei*), and Skate (*Raja porosa*). *Food Sci. Biotechnol.* **2013**, *22*, 909–916.
15. Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H.; Shahidi, F. Isolation and Characterisation of Collagen from the Skin of Brownbanded Bamboo Shark (*Chiloscyllium punctatum*). *Food Chem.* **2010**, *119*, 1519–1526.
16. Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Shahidi, F. Isolation and Characterization of Collagen from the Cartilages of Brownbanded Bamboo Shark (*Chiloscyllium punctatum*) and Blacktip Shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT - Food Sci. Technol.* **2010**, *43*, 792–800.
17. Ministério da Agricultura (MA); <http://www.agricultura.gov.br/sif> acessado em setembro 2016.
18. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)/Ministério do Meio Ambiente (MMA); Instrução Normativa Interministerial MPA/MMA nº 05/2004, Portaria nº 125/2014; <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-tubaroos/portaria-125-2014-aprovacao-tubaroos.pdf> acessado em setembro 2016.
19. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); FAO Yearbook, Fishery and Aquaculture Statistics 2011/FAO Annuaire; FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, **2013**, 76.
20. Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA); Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011; Brasília, **2011**, 60.
21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)/Food and Agriculture Organization of the United Nations(FAO); OECD-FAO Agricultural Outlook, 2014-2023; *OECD- Organ. Econ. Co-operation Dev. Paris*, **2014**, 329.
22. Sidonio, L; Cavalcanti, I. Cavalcanti; Capanema, L. .; Morch, R. .; Magalhães, G. .; Lima, J. .; Burns, V. .; Júnior, A. J. A. .; Mungioli, R. Panorama da Aquicultura no Brasil: Desafios e Oportunidades; *Agroindústria, BNDES Setorial*, **2012**, *35*, 421–463.
23. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio)/Ministério do Meio Ambiente (MMA); Instrução Normativa Interministerial MPA/MMA nº

- 14/2012;
http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2012/in_inter_mpa_mma_14_2012_normasprocedimentoscapturatubaroes_rais.pdf acessado em setembro de 2016.
24. Séret, B. . Guia de Identificação das Principais Espécies de Raias e Tubarões do Atlântico Oriental Tropical, para Observadores de Pesca e Biólogos; 2006, N° ISBN 2-9527741-0-2.
 25. Storer, T. I.; Usinger, R. L.; Stebbins, R. C.; Nybakken, J. W. *Zoologia Geral*; Editora Nacional, Ed.; 6ª ed.; São Paulo, 2002.
 26. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); Código de Conduta para a Pesca Responsável; <http://www.fao.org/docrep/005/v9878e/v9878e00.htm> acessado em setembro de 2016.
 27. Souza, S. N. M. De; Sordi, A.; Oliva, C. A.; B, P. A.; Mestrado, C. De; Unioeste, A. Potencial de Energia Primária de Resíduos Vegetais no Paraná. *4º Encontro Energ. no Meio Rural* **2002**, 2.
 28. Silva, R. D. S. G. Da; Bandeira, S. F.; Petry, F. C.; Pinto, L. A. D. A. Extração de Gelatina a partir das Peles de Cabeças de Carpa Comum. *Ciência Rural* **2011**, 41, 904–909.
 29. Meyer, W.; Seegers, U. Basics of Skin Structure and Function in Elasmobranchs: A Review. *J. Fish Biol.* **2012**, 80, 1940–1967.
 30. Fishbase; *Prionace glauca* <http://www.fishbase.org/summary/898> acessado em setembro em 2016.
 31. International Union for Conservation of Nature (UCN); Lista Vermelha <http://www.iucnredlist.org/search> acessado em setembro de 2016.
 32. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade(ICMBio)/Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis; (IBAMA); Portaria n° 121/1998 http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Portaria/1998/p_ibama_121_n_1998_emalhe_tubaroes_alterada_p_ibama_25_2010_vigente.pdf acessado em setembro 2016.
 33. Fishbase; *Rajidae* <http://www.fishbase.org/summary/FamilySummary.php?ID=19> acessado em setembro 2016.
 34. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. . *Biologia Molecular da Célula*; ARTMED, Ed.; 4ª.; São Paulo, 2004.
 35. Lehninger *Princípios de Bioquímica*; Sarvier, Ed.; 3ª.; São Paulo, 2002.

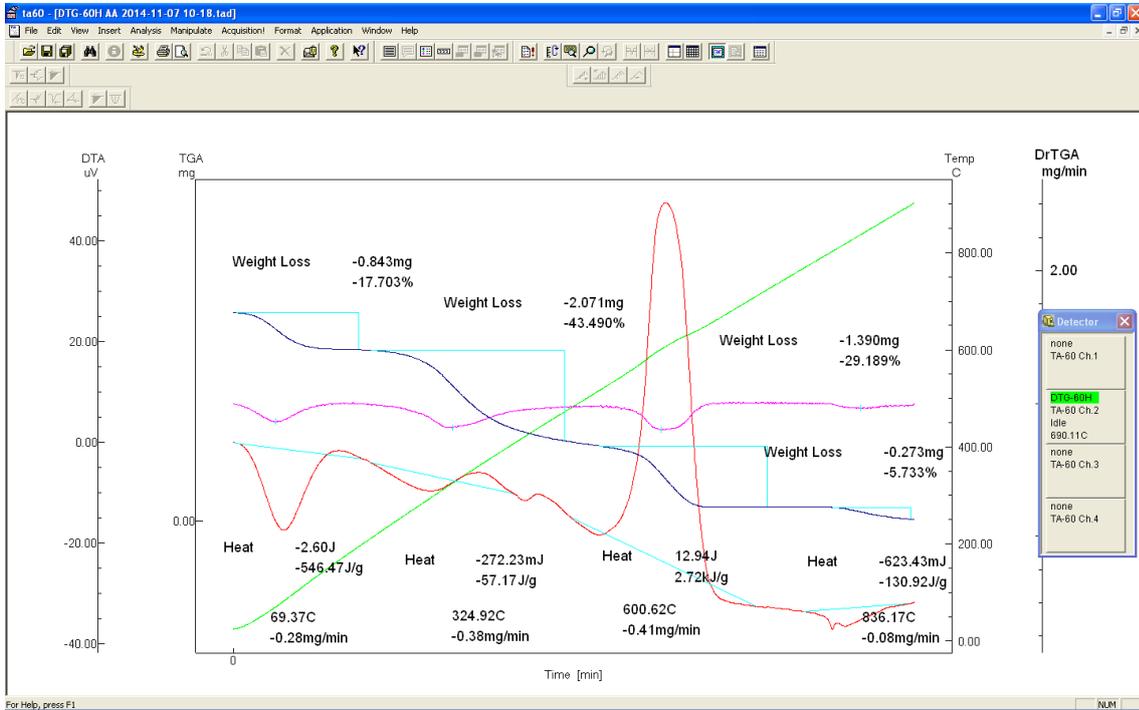
36. Voet, D.; Voet, J. G. . *Bioquímica*; Artmed, Ed.; 3^a.; Porto Alegre, 2006.
37. Jeevithan, E.; Bao, B.; Bu, Y.; Zhou, Y.; Zhao, Q.; Wu, W. Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus Albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 3852–3873.
38. Parenteau-bareil, R. .; Gauvin, R. .; Bareil, R. P.; Gauvin, R.; Berthod, F. . Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications **2010**, 1863–1887.
39. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB); Banco de Dados de Proteína <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> acessado em setembro 2016.
40. Boran, G.; Regenstein, J. M. *5- Fish Gelatin*; 1st ed.; Elsevier Inc., 2010; Vol. 60.
41. Kasankala, L. M.; Xue, Y.; Weilong, Y.; Hong, S. D.; He, Q. ; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 3338.
42. Honsha, K. K. Y. . Bebidas Lácteas Ácidas Estáveis, Processo para a Produção da mesma, e Aditivos para Bebidas Lácteas Ácidas a serem usadas nas mesmas **2003**.
43. Sousa, J. d. F.; Oliveira, A. F. . Pele para Transplantes e Testes Farmacológicos. *J. do Cons. Reg. Química; Ano 23, nº 128*, **2014**.
44. Santos, E. D. B.; Fragoso, E.; Reinaldo, A.; Silva, L. **2009**, *32*, 134.
45. Li, Z. R.; Wang, B.; Chi, C. feng; Zhang, Q. H.; Gong, Y. dan; Tang, J. J.; Luo, H. yu; Ding, G. fang Isolation and Characterization of Acid Soluble Collagens and Pepsin Soluble Collagens from the Skin and Bone of Spanish Mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocoll.* **2013**, *31*, 103–113.
46. Zhang, M.; Liu, W.; Li, G. Isolation and Characterisation of Collagens from the Skin of Largefin Longbarbel Catfish (*Mystus macropterus*). *Food Chem.* **2009**, *115*, 826–831.
47. Silva, T. H.; Moreira-Silva, J.; Marques, A. L. P.; Domingues, A.; Bayon, Y.; Reis, R. L. Marine origin collagens and its potential applications. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5881–5901.
48. Harris, D. C. . *Análise Química Quantitativa*; LTC, Ed.; 5^a.; 2001.
49. McMurry, J. . *Química Orgânica*; LTC, Ed.; 4^a.; Rio de Janeiro, 1997.
50. Shon, J.; Eo, J.; Hwang, J.; Eun, J. . Effect of Processing Conditions on Functional Properties of Collagen Powder from Skate (*Raja kenoeji*) Skins. *Food Sci. Biotechnol.* **2011**, *20*, 169–174.

51. Kittiphattanabawon, P.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Nagai, T.; Tanaka, M. Characterisation of Acid-soluble Collagen from Skin and Bone of Bigeye Snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* **2005**, *89*, 363–372.
52. Barros, H. L. C. . *Química Inorgânica*; Belo Horizonte, 1992.
53. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. . *Introdução à Espectroscopia*; Learning, C., Ed.; 4^a.; São Paulo, 2010.
54. Trevisan, M. G. QUÍMICA ANALÍTICA DE PROCESSOS **2006**, *29*, 1065–1071.
55. Duan, R.; Zhang, J.; Du, X.; Yao, X.; Konno, K. Properties of Collagen from Skin, Scale and Bone of Carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem.* **2009**, *112*, 702–706.
56. Lopes, W. A.; Fascio, M. Esquema para Interpretação de Espectros de Substâncias Orgânicas na Região do Infravermelho. *Quim. Nova* **2004**, *27*, 670–673.
57. Bernal, C.; Boldarini Couto, A.; Trazzi Breviglieri, S.; Gomes Cavalheiro, É. T. ; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 849.
58. Cavalheiro, G. A Influência de Fatores Experimentais na Análises Termogravimétricas.pdf. *Quim. Nova* **1995**, *18*, 305–308.
59. Tonhi, E.; De Guzzi Plepis, A. M. Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-Quitosana. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 943–948.
60. Hwang, J. H.; Mizuta, S.; Yokoyama, Y.; Yoshinaka, R. Purification and Characterization of Molecular Species of Collagen in the Skin of Skate (*Raja kenoei*). *Food Chem.* **2007**, *100*, 921–925.
61. Zhang, Y.; Liu, W.; Li, G.; Shi, B.; Miao, Y.; Wu, X. Food Chemistry Isolation and Partial Characterization of Pepsin-soluble Collagen from the Skin of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) **2007**, *103*, 906–912.
62. Limpisophon, K.; Tanaka, M.; Weng, W.; Abe, S.; Osako, K. Characterization of Gelatin Films Prepared from Under-utilized Blue Shark (*Prionace glauca*) Skin. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1993–2000.

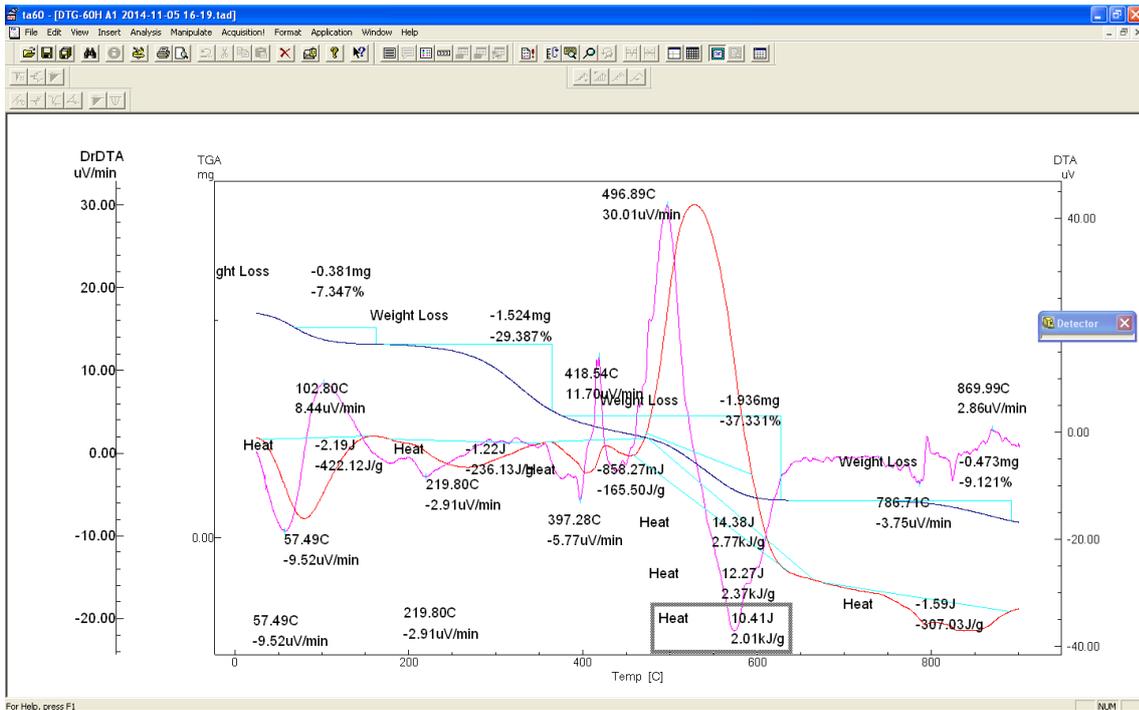
ANEXOS

ANÁLISES TG/TDG DAS AMOSTRAS DE ASC

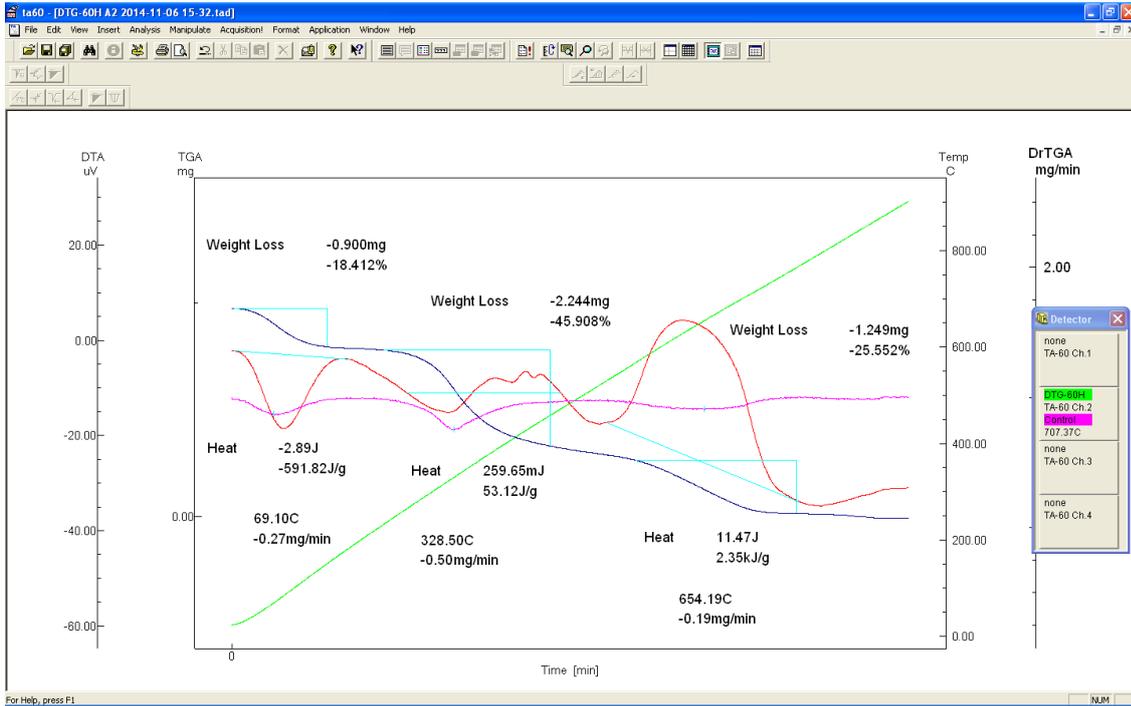
TG/TDG DE ASC AA



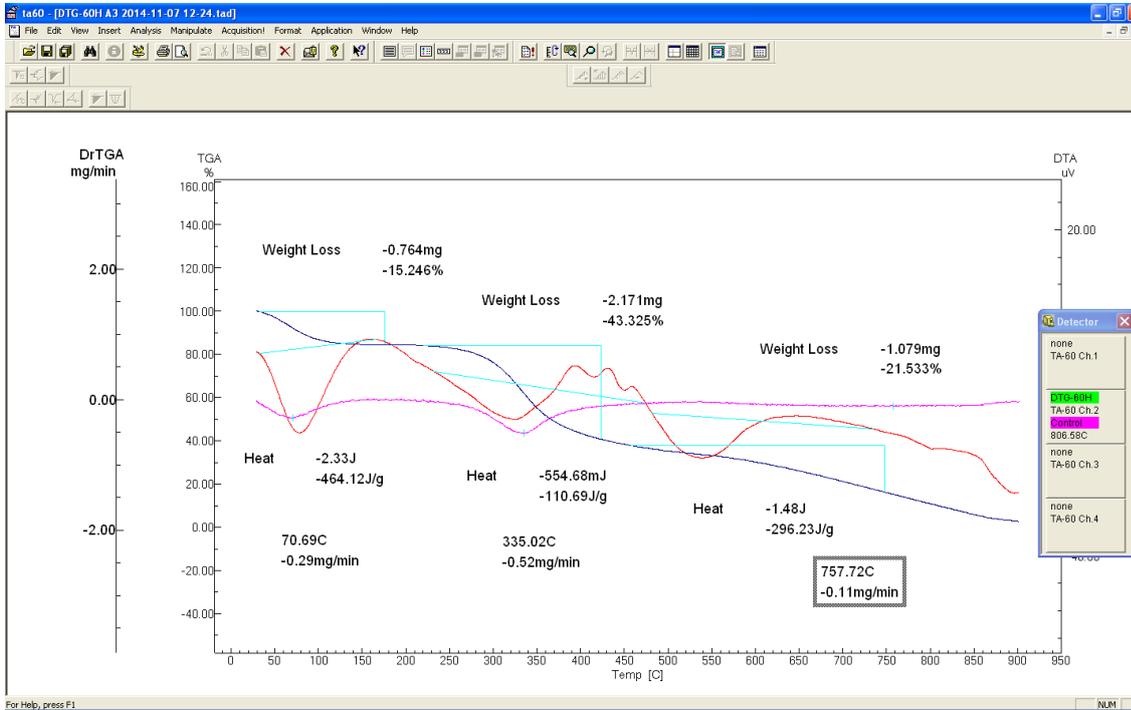
TG/TDG DE ASC A1



TG/TDG DE ASC A2



TG/TDG DE ASC A3



TG/TDG DE ASC C1

