

Compostos bioativos de resíduos de cascas de camarão: o seu potencial e incorporação em produtos de valor acrescentado

Flávia Inês Teixeira Gonçalves

Mestrado em Aplicações em Biotecnologia e Biologia
Sintética

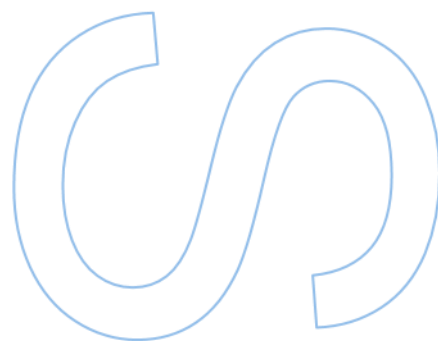
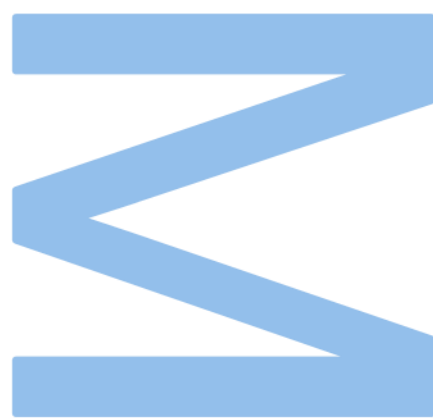
Departamento de Química e Bioquímica; Departamento de Biologia
2023

Orientadora

Manuela M. Moreira, Investigadora, REQUIMTE/LAQV-ISEP

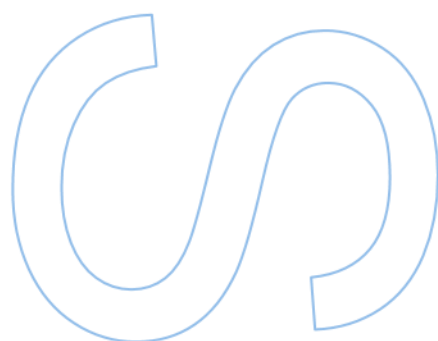
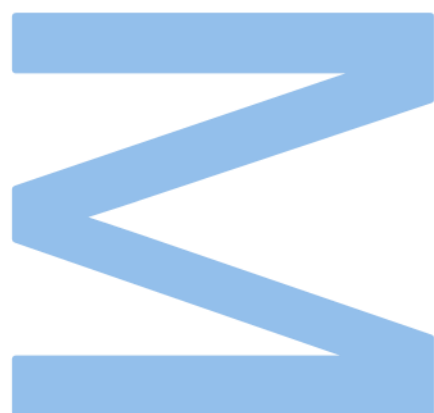
Coorientadora

Andreia Peixoto, Investigadora, REQUIMTE/LAQV-FCUP





EXPL/BII-BIO/0436/2021



“- Is this everything you were hoping for?

- It's got its ups and downs. But...you can't deny the view though.”

Joel e Ellie, *The Last of Us* (2013)

Agradecimentos

Terminar a minha formação académica é, para mim, um grande motivo de orgulho, pois é algo que sempre ambicionei alcançar. Apesar de todo o meu esforço, esta etapa da minha vida não teria sido concluída se não fosse pelo apoio de várias pessoas, às quais quero agradecer.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Dra. Manuela Moreira por ter estado sempre presente e disposta a ajudar, pela simpatia, paciência e por todos os ensinamentos transmitidos. Quero também agradecer à Dra. Andreia Peixoto por me ter ajudado sempre que necessitei e pela sua disponibilidade. Agradeço também à Dra. Elsa Vieira e à Dra. Iwona Biernacka por toda a ajuda prestada.

Agradeço ao Rodrigo Oliveira da INNOVCAT por ceder os extratos necessários para a realização deste trabalho, assim como ao REQUIMTE/LAQV-ISEP por cederem as instalações que me permitiram realizar a parte experimental desta dissertação. Agradeço também à Inês Conceição pelo material cedido.

Quero agradecer especialmente à minha mãe e à minha avó, por sempre me apoiarem e sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu não o fiz.

Agradeço também ao Alexandre e à Tânia, por serem os meus companheiros nesta jornada e por me relembrares que “só não é possível se não acreditares”.

À Regina por ser a minha amiga desde sempre e estar presente em todas as ocasiões.

Por último, mas não menos importante, aos meus Gatões: Catarina, Eduarda, Matilde, Marco e Patrícia. Obrigada por serem o melhor grupo de amigos que alguém pode ter, espero poder continuar a ter o privilégio de crescer com vocês.

A todos, o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

As cascas de camarão são um resíduo abundante devido ao aumento do consumo destes crustáceos a nível mundial. Estas são depositadas em aterros, e, por vezes, até nos oceanos, representando um grave problema económico, ambiental e social. Assim sendo, há necessidade de lhes atribuir um uso rentável e ambientalmente vantajoso.

As cascas de camarão são uma fonte de compostos antioxidantes, como a astaxantina e outros carotenoides, assim como de quitina, que é o composto presente maioritariamente na sua composição. Estes compostos têm o potencial para serem usados em produtos de valor acrescentado na indústria alimentar e cosmética, por exemplo.

Neste trabalho pretendia-se utilizar e avaliar a eficiência de diferentes técnicas de extração para recuperar compostos bioativos das cascas de camarão e avaliar a sua atividade biológica e potencial aplicação em produtos de valor acrescentado na indústria alimentar e/ou cosmética. Para isso, foram testadas diferentes técnicas de extração, nomeadamente a extração convencional (EC), extração assistida por ultrassons (EAU) e extração com água em condições subcríticas (ESA), com diferentes solventes e temperaturas. Para avaliar a eficiência das técnicas de extração determinou-se o teor de polifenóis total (TPT), teor de carotenoides total (TCT), a atividade antioxidante pelo método ABTS e o poder redutor pelo método FRAP.

Das diferentes técnicas testadas, a ESA a 200°C foi a que se mostrou mais eficiente, com um TPT de $5,36 \pm 0,07$ mg EAG/g de casca de camarão e $59,8 \pm 1,0$ mg carotenoides/g de cascas de camarão, valores cerca de 5 vezes superiores aos obtidos pela EC.

Paralelamente, pretendeu-se ainda avaliar a extração de quitina das cascas de camarão e desacetilação em quitosano. O quitosano final obtido foi usado para a produção de um filme, com o intuito de os usar para embalar alimentos. Para isso recorreu-se a técnicas convencionais de desmineralização (usando ácido cítrico), desproteinização e desacetilação que foram aplicadas nas cascas de camarão e no extrato sólido resultante da ESA a 200°C para a obtenção de quitina e respetiva conversão em quitosano. A presença destes compostos foi avaliada pelas técnicas de espectroscopia FTIR e UV-Vis de primeira derivada, que mostraram a presença de quitosano e uma concentração do seu monómero, N-acetilglucosamina, de $1,12 \times 10^{-2}$

mg/mL nas cascas de camarão e de $2,0 \times 10^{-2}$ mg/mL no extrato sólido da ESA. Posteriormente prepararam-se filmes, adicionando ácido acético em diferentes concentrações para dissolver o quitosano e glicerol em diferentes quantidades, como plastificante. O filme em que se adicionou 0,1g de glicerol e solvente com uma concentração de 2% (v/v) (filme 4) foi o que obteve melhor valor de opacidade e barreira UV, mas apresentou piores propriedades mecânicas comparativamente aos filmes preparados com quitosano comercial.

Palavras-chave: cascas de camarão, astaxantina, quitina, quitosano, extração com água em condições subcríticas, filmes de biopolímeros.

Abstract

Shrimp shells are an abundant residue due to the increased crustacean consumption worldwide. These shells are discarded in landfills, and even in the ocean, representing a severe economic, environmental, and social problem. Therefore, there is a need to assign them a profitable and environmentally advantageous use.

Shrimp shells are a source of antioxidant compounds, like astaxanthin and other carotenoids, and a source of chitin, which is the main compound present in its composition. These compounds have the potential to be used in high-value products, for example in the food and/or cosmetic industries.

The main goal of the present work was to evaluate the efficiency of different extraction techniques to recover bioactive compounds from the shrimp shells and evaluate its biological activity and potential application in high-value products in the food and cosmetic industries. For that, different extraction techniques were tested, namely conventional extraction (CE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and subcritical water extraction (SWE), using different solvents and temperatures. To evaluate their efficiency, total polyphenol content (TPC), total carotenoid content (TCC), antioxidant activity by the ABTS radical scavenging activity (ABTS) and reducing power by the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assays were determined.

From the different extraction techniques tested, SWE at 200°C was the most efficient with a TPC of 5.36 ± 0.07 mg GAE/g dry weight and 59.8 ± 1.0 µg carotenoids/g dry weight, values 5 times higher than the ones obtained in CE.

At the same time, it was intended to evaluate chitin extraction from the shrimp shells and its deacetylation into chitosan. The obtained chitosan was used to produce a biopolymer-based film to food packages. For that, demineralization (with citric acid), deproteinization and deacetylation conventional techniques were applied in the shrimp shells and in the solid extract from SWE at 200°C to obtain chitin and convert it into chitosan. The presence of these compounds was tested using FTIR and first derivative UV-Vis spectroscopy methods, which showed the presence of chitosan and a concentration of 1.12×10^{-2} mg/mL of its monomer, N-acetylglucosamine, in the shells, and of 2.0×10^{-2} mg/mL in the solid extract from SWE.

Afterwards, the films were prepared, using acetic acid in several concentrations to dissolve the chitosan, and the plasticizer, glycerol, was also added in different

amounts. The film prepared with 0.1g of glycerol and a concentration of acetic acid of 2% (v/v) (film 4) was the one with the best values of opacity and UV barrier but showed weaker mechanical properties in comparison with the films prepared using commercial chitosan.

Keywords: shrimp shells, astaxanthin, chitin, chitosan, subcritical water extraction, biopolymer-based films.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Lista de Tabelas	x
Lista de Gráficos.....	xi
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xv
1. Introdução.....	1
1.1 Camarão.....	1
1.1.1 Produção de camarão e resíduos gerados	1
1.1.2 Composição das cascas de camarão	2
1.2 Astaxantina.....	3
1.3 Compostos fenólicos	4
1.3.1 Classificação	5
1.3.2 Compostos antioxidantes presentes nas cascas de camarão.....	6
1.4 Métodos de extração de compostos bioativos	6
1.4.1 Extração convencional.....	6
1.4.2 Extração assistida por ultrassons	7
1.4.3 Extração subcrítica com água.....	8
1.5 Métodos colorimétricos.....	9
1.5.1 Teor de polifenóis total	9
1.5.2 Teor de carotenoides total	9
1.5.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição de radicais pelo catião ABTS.....	10
1.5.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método da redução do Ferro (FRAP)	11
1.6 Quitina e Quitosano	12
1.7 Filmes baseados em biopolímeros	13
2. Objetivos.....	15

3.	Materiais e Métodos	16
3.1	Reagentes	16
3.2	Preparação das amostras.....	16
3.3	Métodos de extração de compostos bioativos	17
3.3.1	Extração convencional.....	17
3.3.2	Extração assistida por ultrassons	17
3.3.3	Extração subcrítica com água.....	17
3.4	Determinação do teor de polifenóis e carotenoides totais e atividade antioxidante.....	17
3.4.1	Determinação do TPT.....	17
3.4.2	Determinação do TCC	18
3.4.3	Determinação do poder redutor pelo método FRAP	18
3.4.4	Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS.....	19
3.5	Processos de desmineralização, desproteinização e desacetilação da casca de camarão para obtenção de quitosano.	19
3.6	Determinação da presença de quitina e quitosano através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	21
3.7	Determinação da quantidade de quitina e quitosano por espectroscopia Ultravioleta-Visível.....	21
3.7.1	Determinação do <i>zero crossing point</i>	22
3.8	Preparação dos filmes com quitosano extraído das cascas de camarão	22
3.8.1	Humidade	23
3.8.2	Capacidade de retenção de água	23
3.8.3	Solubilidade.....	23
3.8.4	Espessura	24
3.8.5	Propriedades mecânicas	24
3.8.6	Opacidade e capacidade da barreira UV	24
4.	Resultados e Discussão	25
4.1	Comparação das técnicas de extração testadas.....	25

4.1.1	Teor de polifenóis total	25
4.1.2	Teor de carotenoides total	26
4.1.3	Atividade antioxidante determinada pelo método ABTS	28
4.1.4	Atividade antioxidante determinada pelo método FRAP	29
4.2	Espectro FTIR das cascas de camarão e dos extratos obtidos da ESA a 200°C 31	
4.3	Determinação da concentração de quitosano nas cascas de camarão.....	33
4.3.1	Determinação do <i>zero crossing point</i>	33
4.3.2	Determinação da curva de calibração de GlcNAc.....	34
4.3.3	Determinação da concentração de quitosano nas cascas de camarão e no extrato da ESA.....	36
4.4	Propriedades dos filmes de quitosano	37
4.4.1	Resistência à humidade e solubilidade	38
4.4.2	Espessura	40
4.4.3	Propriedades mecânicas	42
4.4.4	Opacidade e capacidade da barreira UV	45
5.	Conclusão e perspetivas de trabalho futuro	49
6.	Referências Bibliográficas	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Diferentes condições de preparação dos filmes de quitosano.....	22
Tabela 2 – Valores de abs da primeira derivada para $\lambda = 203$ nm do espectro de GlcNAc e valores de abs após subtração da contribuição do ácido acético 0,01M.	35
Tabela 3 - Valores da 1ª derivada do espectro do UV-Vis das soluções de quitosano preparadas a $\lambda = 203$ nm e valores de concentração de GlcNAc (em mg/mL) nas amostras de quitosano.....	37

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Valores de $dA/d\lambda_{\text{GlcNAc}} - dA/d\lambda_{\text{AcOH}}$ em função das concentrações de GlcNAc.	35
Gráfico 2 – Valores da primeira derivada das amostras de quitosano obtido em laboratório e quitosano comercial.	36

Lista de Figuras

Figura 1 – Espécie de camarão <i>Penaeus Monodon</i> , comercialmente denominado Camarão-tigre gigante ⁴ .	1
Figura 2 – Estrutura química da Astaxantina ¹⁶ .	3
Figura 3 – <i>Haematococcus pluvialis</i> , a maior fonte de astaxantina utilizada ¹⁴ .	3
Figura 4 – Estrutura química de diferentes tipos de compostos fenólicos ¹⁷ .	4
Figura 5 – Estrutura química de um radical fenoxi ¹⁸ .	4
Figura 6 – Funcionamento de um extrator ultrassónico ²⁸ .	7
Figura 7 – Ação dos ultrassons no solvente ²⁵ .	8
Figura 8 – Diagrama de fases da água em função da temperatura e pressão ²³ .	9
Figura 9 – Estrutura química do ABTS ³⁶ .	10
Figura 10 – Diferentes níveis de inibição do catião ABTS ³⁸ (da esquerda para a direita verifica-se um aumento da atividade antioxidante).	11
Figura 11 – Reação de redução do complexo Ferro – TPTZ ⁴⁰ .	11
Figura 12 – Estrutura química da quitina (em cima) e do quitosano (em baixo) ⁴² .	12
Figura 13 – Reação de conversão de quitina em quitosano ⁴⁶ .	13
Figura 14 – Garrafas de água fabricadas com plástico PET, um dos plásticos mais utilizados a nível mundial.	14
Figura 15 - Cascas de camarão após as reações de desmineralização, desproteinização e desacetilação.	20
Figura 16 – Teor de polifenóis total para os extratos de casca de camarão; resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g casca camarão, média ± desvio padrão, n=3.	26
Figura 17 – Teor de carotenoides total para os extratos da casca de camarão; resultados expressos em µg de carotenoides/g de casca camarão, média ± desvio padrão, n=3.	27
Figura 18 – Atividade antioxidante determinada pelo método de inibição de radicais pelo catião ABTS; resultados expressos em mg de equivalentes ácido ascórbico/g de casca camarão, média ± desvio padrão, n=3.	29
Figura 19 – Atividade antioxidante determinada pelo método FRAP; resultados expressos em mg de equivalentes ácido ascórbico/g de casca camarão, média ± desvio padrão, n=3.	30
Figura 20 – Espectros de FTIR obtidos para o quitosano comercial, quitina comercial, quitosano extraído diretamente das cascas e quitosano obtido a partir da ESA a 200°C.	32

Figura 21 - Espectro FTIR do quitosano obtido a partir das cascas de camarão; obtido por Moosa <i>et al.</i> ⁶³	33
Figura 22 – Espectro UV-Vis das soluções de ácido acético de concentrações 0,01M, 0,02M e 0,03M. À esquerda está o espectro de ordem zero e à direita o espectro da primeira derivada.	34
Figura 23 – Espectro UV-Vis da primeira derivada das soluções de GlcNAc de diferentes concentrações em ácido acético 0,01M.....	34
Figura 24 – Filmes de quitosano obtidos nas diferentes condições: filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).	38
Figura 25 – Capacidade de retenção da água dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).	39
Figura 26 - Percentagem de solubilidade dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).	40
Figura 27 - Espessura média dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).	41
Figura 28 - Máxima tensão dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).	43
Figura 29 - Capacidade elástica dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2%	

ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol). 44

Figura 30 - Percentagem de máxima deformação dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol). 45

Figura 31 - Opacidade dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol). 46

Figura 32 - Capacidade da barreira UV dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol). 47

Lista de Abreviaturas

ABS	ABSORVÂNCIA
ABTS	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DETERMINADA PELO MÉTODO ABTS
CC	CASCA DE CAMARÃO
CM	CENTÍMETROS
EAA	EQUIVALENTES DE ÁCIDO ASCÓRBICO
EAG	EQUIVALENTES DE ÁCIDO GÁLICO
EAU	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSONS
EC	EXTRAÇÃO CONVENCIONAL
ESA	EXTRAÇÃO COM ÁGUA EM CONDIÇÕES SUBCRÍTICAS
ETOH	ETANOL
FC	FOLIN-CIOCALTEU
FRAP	<i>FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER</i> , DO INGLÊS ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP
FTIR	<i>FOURIER-TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY</i> , DO INGLÊS ESPETROSCOPIA DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER
GD	GRAU DE DESACETILAÇÃO
GLCNAC	N-ACETILGLUCOSAMINA
HPLC	<i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY</i> , DO INGLÊS CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
NAOH	HIDRÓXIDO DE SÓDIO
NM	NANÓMETROS
TA	TEMPERATURA AMBIENTE
TCT	TEOR DE CAROTENOIDES TOTAL
TPT	TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS
UV-VIS	ESPETROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL
WHC	<i>WATER HOLDING CAPACITY</i> , DO INGLÊS CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA
TPTZ	2,4,6-TRIS(2-PIRIDIL)-S-TRIAZINA

1. Introdução

1.1 Camarão

Os camarões são uma espécie de crustáceos espalhada por todo o planeta e podem ser encontrados no mar, estuários, rios e lagos¹. Estes animais são consumidos em grandes quantidades e representam uma parte importante da cadeia alimentar de vários animais marinhos¹.

Algumas espécies de camarão, além de serem uma boa fonte de proteína e possuírem uma baixa percentagem de gordura², têm um sabor agradável e, por isso, são largamente consumidos por humanos.

Várias espécies de camarão são capturadas e produzidas para consumo humano, sendo as mais comuns as espécies da família *Penaeidae* (figura 1)³.

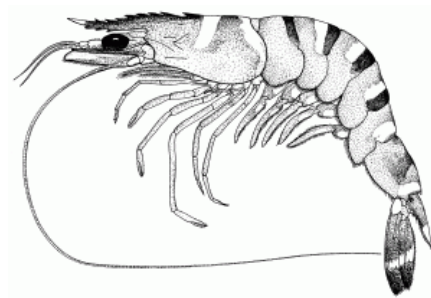


Figura 1 – Espécie de camarão *Penaeus Monodon*, comercialmente denominado Camarão-tigre gigante⁴.

1.1.1 Produção de camarão e resíduos gerados

Com o aumento do consumo de camarão pelos humanos houve uma necessidade de aumentar também a sua produção, surgindo assim a aquacultura de camarão. Em Portugal, a pesca do camarão foi aberta em 2020, após estar moratória desde 2010⁴.

Como qualquer indústria, a aquacultura de camarão e o seu desenvolvimento apresentam consequências a nível económico, social e ambiental⁵. Dentro das consequências destacam-se a disseminação de doenças entre os camarões cultivados, perturbação do ecossistema e contaminação das águas⁵.

A aquacultura de camarão gera uma grande quantidade de resíduos, nomeadamente as cascas de camarão, cuja produção global calculada em base seca é de aproximadamente 1,44 milhões de toneladas⁶.

O processamento do camarão e a grande quantidade de resíduos gerados constituem um problema crescente⁷, pois aproximadamente 50% do peso deste animal é descartado⁸.

As cascas de camarão são biodegradáveis e não acumulam na natureza por longos períodos. No entanto, têm um cheiro intenso e desagradável, o que pode atrair algumas espécies de animais e gerar colónias de bactérias, que poderão ser danosas para a saúde humana⁸.

Assim, o reaproveitamento destes resíduos tem gerado grande interesse, pois são uma fonte de recursos renovável⁸, sustentável e permitiria resolver este problema iminente.

Devido à sua composição química, a casca de camarão pode tornar-se num resíduo altamente rentável⁹ para a indústria alimentar ou até para a indústria cosmética, diminuindo assim a magnitude do problema que representa.

1.1.2 Composição das cascas de camarão

A composição do camarão e da sua casca irá depender da espécie em estudo, assim como da estação do ano em que a análise às cascas é feita¹⁰. No entanto, vários estudos foram realizados e tem sido possível determinar valores aproximados da sua composição.

As cascas dos camarões apresentam três componentes principais: quitina, proteína e “cinza”⁶ (minerais, enzimas, lípidos e pigmentos⁷). A quantidade de proteína varia entre os 20 e os 40%, a de quitina entre os 15 e os 40% e a quantidade de cinza representa mais de 50% da sua composição, sendo que de 20 a 50% é carbonato de cálcio¹¹.

Alguns dos compostos presentes nas cascas de camarão apresentam atividade antioxidante, como é o caso da astaxantina, que é o carotenoide presente em maior quantidade nos crustáceos, como irá ser referido em 1.2. Os antioxidantes naturais apresentam grande interesse comercial¹² devido às suas propriedades e benefícios para a saúde e, por isso, o estudo da presença destes compostos nas cascas de camarão é relevante.

1.2 Astaxantina

A astaxantina (figura 2) é um carotenoide lipossolúvel que apresenta uma cor avermelhada, é o carotenoide presente em maior quantidade nos crustáceos e é o que apresenta maior atividade antioxidante nestas espécies⁹, devido às suas ligações duplas conjugadas e grupos hidroxilo (-OH) que reagem com radicais livres dentro e fora das células membranares¹³.

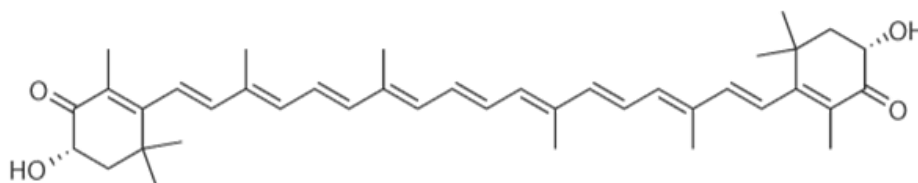


Figura 2 – Estrutura química da Astaxantina¹⁶.

Apresenta vários benefícios para a saúde⁹ e tem propriedades antienvhecimento e anticancerígenas, assim como eficácia no tratamento de doenças cardiovasculares¹⁴. A astaxantina também tem aplicação na indústria cosmética pois ajuda a aumentar a elasticidade da pele e a melhorar a pele seca¹¹.

A sua capacidade antioxidante é mais forte que de compostos como a vitamina E, vitamina C e β -Caroteno e também pode ser utilizada como corante em alimentos¹¹.

Os dois métodos mais comuns de produção de astaxantina incluem síntese química e biológica¹⁴. A síntese química deste composto é mais barata, no entanto, o consumo de astaxantina obtida por síntese química por humanos não é permitido por questões de segurança¹⁴.

Assim sendo, há necessidade de obter astaxantina via síntese biológica e, por isso, há grande interesse económico em extrair este carotenoide da forma mais barata e eficiente possível. Atualmente, as maiores fontes de astaxantina são a microalga *Haematococcus pluvialis* (figura 3) e diferentes espécies de crustáceos¹⁴.

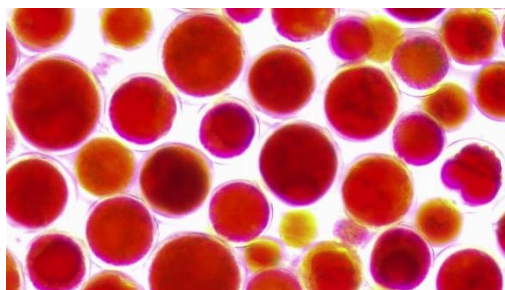


Figura 3 – *Haematococcus pluvialis*, a maior fonte de astaxantina utilizada¹⁴.

1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (figura 4) são compostos que estão presentes na maioria dos alimentos à base de plantas¹⁵, como frutas, vegetais e cereais, sendo os compostos antioxidantes mais presentes na dieta humana¹⁶. São caracterizados por possuírem vários anéis fenólicos que formam ligação com grupos hidroxilo¹⁵.

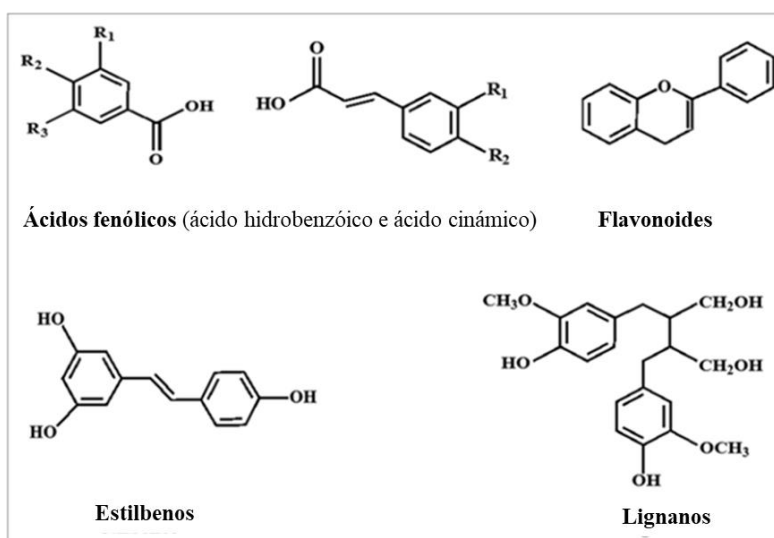


Figura 4 – Estrutura química de diferentes tipos de compostos fenólicos¹⁷.

Estes compostos apresentam imensos benefícios para a saúde, nomeadamente na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose, assim como funções na prevenção de doenças neurodegenerativas¹⁶. Devido à sua capacidade antioxidante, os polifenóis podem atuar diretamente em espécies reativas ao oxigénio e estimulando sistemas de defesa endógenos¹⁶. Os grupos fenólicos destas espécies têm a capacidade de aceitar um eletrão para formar radicais fenoxi (figura 5) estáveis, quebrando assim as reações de oxidação em cadeia nos componentes celulares¹⁶.

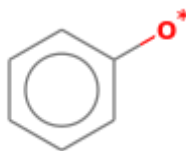


Figura 5 – Estrutura química de um radical fenoxi¹⁸.

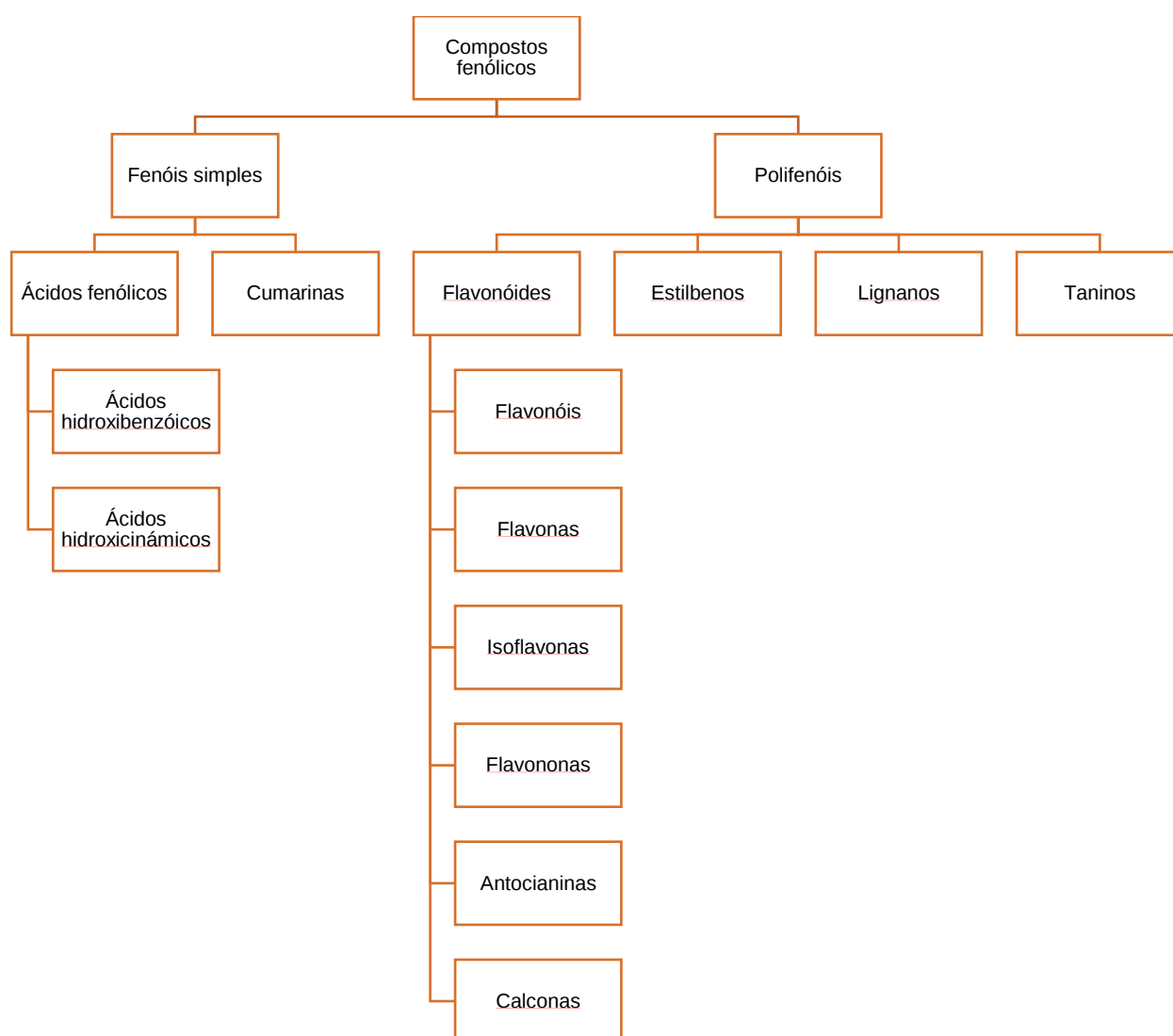
Os compostos fenólicos são muito variados, sendo que a sua estrutura pode ir de moléculas simples a compostos altamente polimerizados¹⁹ e, por isso, são

classificados em diferentes categorias, dependendo da sua estrutura química e da sua função.

1.3.1 Classificação

Como referido anteriormente, os compostos fenólicos podem ser divididos em diferentes categorias, dependendo do número de anéis fenólicos que os compõem e da sua estrutura química.

Estes compostos podem ser classificados em várias categorias, de acordo com a forma como se formaram na natureza, a sua estrutura e função, como descrito na figura 6²⁰.



Esquema 1 – Diferentes tipos de compostos fenólicos²⁰.

1.3.2 Compostos antioxidantes presentes nas cascas de camarão

As cascas de camarão apresentam na sua composição alguns compostos com atividade antioxidante.

Como já referido anteriormente, a astaxantina é um carotenoide presente nas cascas de camarão e que lhes atribui a sua cor característica, tendo grande atividade antioxidante e diversos benefícios para a saúde. A astaxantina representa cerca de 65% a 98% dos carotenoides presentes nas cascas de camarão, dependendo da espécie em estudo, da dieta dos camarões, da estação do ano, entre outros fatores²¹.

O β -Caroteno é também um carotenoide com atividade antioxidante presente em grande quantidade nas cascas de camarão²². Está muito presente, também, em frutas e vegetais amarelos e cor de laranja, para além de ser um precursor da vitamina A quando este está em falta no organismo humano²³. Este composto bloqueia a ação de moléculas de oxigénio que possam causar dano nas células e o seu consumo em alimentos apresenta benefícios anticancerígenos²³.

A quitina e o seu derivado quitosano, que serão abordados com maior detalhe em 1.6, são polissacarídeos extraídos do exoesqueleto dos camarões e que apresentam atividade antioxidante, estando descrito na literatura como inibidores de espécies reativas ao oxigénio²⁴.

Também alguns hidrolisados de proteínas preparados a partir de cascas de camarão apresentaram atividade antioxidante, que poderão ser utilizados na indústria alimentar²⁵.

1.4 Métodos de extração de compostos bioativos

1.4.1 Extração convencional

Os métodos de extração convencionais de diferentes compostos bioativos têm sido amplamente utilizados durante vários anos. Consistem em várias técnicas que recorrem ao uso de temperatura, agitação ou uma combinação de ambos, incluído a maceração, percolação e extração sob refluxo, exigindo um uso elevado de solventes orgânicos e longos tempos de extração²⁶.

Dada a pouca eficiência destes métodos, há uma necessidade de os melhorar, tornando-os mais amigos do ambiente e mais rápidos, surgindo assim métodos de

extração mais verdes como a extração assistida por ultrassons, extração assistida por microondas ou extração subcrítica e supercrítica, por exemplo.

1.4.2 Extração assistida por ultrassons

A extração assistida por ultrassons (figura 6) é frequentemente utilizada e há bastante literatura focada neste método de extração^{9,27}.

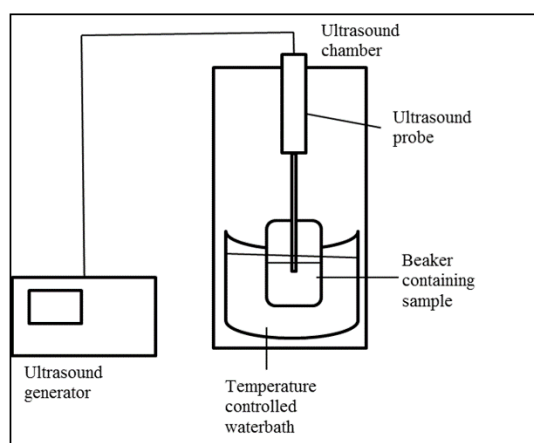


Figura 6 – Funcionamento de um extrator ultrassónico²⁸.

As ondas de ultrassom são ondas mecânicas que fazem uso de meios elásticos para se propagarem e têm uma frequência compreendida entre os 20 kHz e os 10 MHz²⁹.

Quando induzidas num meio líquido, ocorre um fenómeno denominado de cavitação²⁹, que consiste na formação de bolhas no líquido causadas pela variação da pressão. As moléculas do solvente interagem entre si através de forças atrativas e os ultrassons exercem uma força longitudinal, funcionando como um pistão que comprime e descomprime o solvente²⁹, como esquematizado na figura 7. As moléculas, com o movimento de compressão causado pelas ondas, saem, temporariamente, do sítio e podem colidir umas com as outras. Quando o solvente descomprime, pode haver a formação de um “vazio”, que são as bolhas da cavitação formadas por gases dissolvidos²⁹.

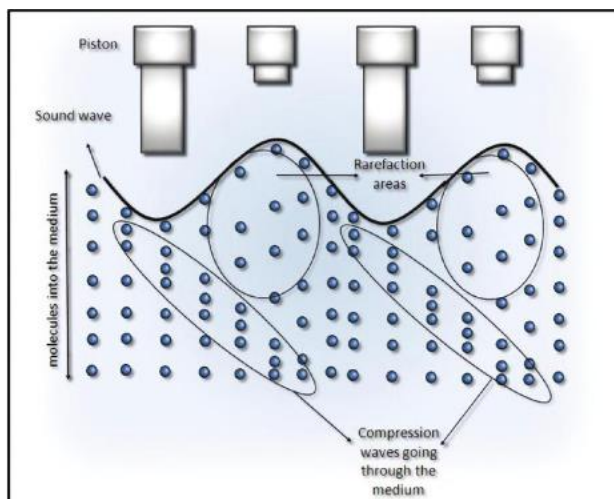


Figura 7 – Ação dos ultrassons no solvente²⁵.

Quando as bolhas formadas colapsam na superfície, há uma quebra da matriz e os compostos que se pretendem extrair são libertados para o meio²⁹.

Esta técnica de extração é bastante usada em diversas indústrias, como a farmacêutica e alimentar, devido ao tempo de extração mais curto, baixo consumo de energia e rendimentos elevados relativamente aos métodos de extração convencionais³⁰.

1.4.3 Extração subcrítica com água

A extração subcrítica com água é um método de extração recente eficiente e consiste em usar água como solvente a temperaturas entre os 100 e os 374°C e com pressão suficiente para a água ser mantida no estado líquido³¹. Este tipo de extração permite extrair diversos tipos de compostos, dependendo da temperatura utilizada, ou seja, compostos polares são extraídos a temperaturas mais baixas e compostos apolares são extraídos a temperaturas mais elevadas³².

À medida que a temperatura aumenta, há uma diminuição sistemática da permissividade (capacidade de um composto se polarizar em resposta a um campo elétrico), um aumento da taxa de difusão e diminuição da viscosidade e tensão superficial³². Como consequência, compostos polares (que são altamente solúveis em água) são extraídos facilmente a temperaturas mais baixas e compostos menos polares precisam de um meio menos polar para serem extraídos, que será induzido por temperaturas mais elevadas³².

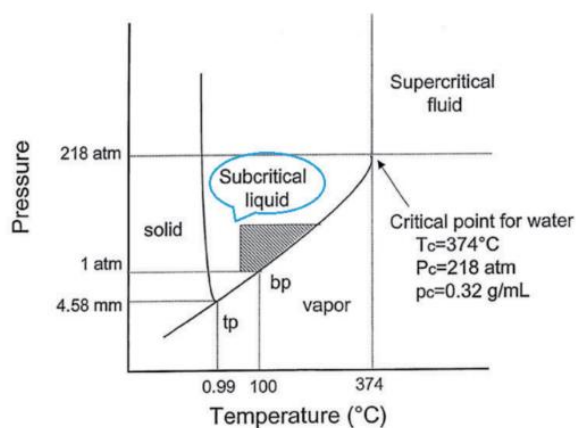


Figura 8 – Diagrama de fases da água em função da temperatura e pressão²³.

A extração subcrítica com água é um método rápido e “verde”, que tem permitido obter melhores resultados em comparação com métodos de extração convencionais³¹.

1.5 Métodos colorimétricos

1.5.1 Teor de polifenóis total

Para determinar o teor de polifenóis total utilizou-se o método colorimétrico Folin-Ciocalteu³³. Este método utiliza o reagente Folin-Ciocalteu (FC) que consiste numa solução amarela de iões poliméricos formada por ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, como agente colorimétrico³³. Este reagente oxida fenolatos, reduzindo os heteropoliácidos e formando um complexo de cor azul³³. Os fenolatos só estão presentes em soluções alcalinas, mas tanto os reagentes, como os produtos não são estáveis em soluções básicas e, por isso, neste procedimento, é utilizada uma alta concentração de reagentes e uma basicidade moderada³³.

Quanto mais azul for a solução final, maior teor de compostos fenólicos totais apresenta a amostra.

1.5.2 Teor de carotenoides total

A maioria dos carotenoides apresentam absorção na zona do visível entre os 400 e os 500 nm (zona do azul/verde)³⁴, dependendo do carotenoide em estudo. A astaxantina, por exemplo, apresenta um pico de absorção máxima nos 492 nm³⁵.

Assim sendo, é possível medir a quantidade de carotenoides presentes em determinada amostra medindo a absorvância (abs) nos comprimentos de onda referidos. Para se obter uma maior precisão de resultados, também se pode medir a abs em comprimentos de onda maiores (correspondentes à zona do laranja e vermelho), para detetar a presença de compostos indesejados.

Por fim, subtrai-se os comprimentos de onda da zona do azul pelos da zona do vermelho, e torna-se assim possível identificar a concentração de carotenoides, ainda que este método não seja altamente preciso.

1.5.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição de radicais pelo catião ABTS

A inibição de radicais pelo catião ABTS (figura 9) é um método comumente utilizado para a determinação da atividade antioxidante de compostos. Este método mede a capacidade dos compostos antioxidantes de inibirem o catião ABTS, que tem uma cor azul intensa.

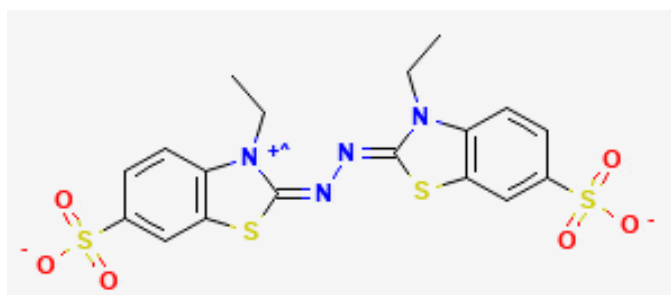


Figura 9 – Estrutura química do ABTS³⁶.

A reação ocorre entre o radical ABTS e o persulfato de potássio, numa solução que é previamente preparada, produzindo o composto ABTS³⁷. Adicionando compostos antioxidantes a esta solução, o catião irá sofrer uma reação de redução até certo nível, dependendo da atividade antioxidante³⁷. Quando esta reação ocorre, o ABTS descolora, ou seja, quanto mais escura for a solução final, menos o catião reduziu, logo, menor atividade antioxidante existe³⁷, como se pode verificar no exemplo fornecido na figura 10.

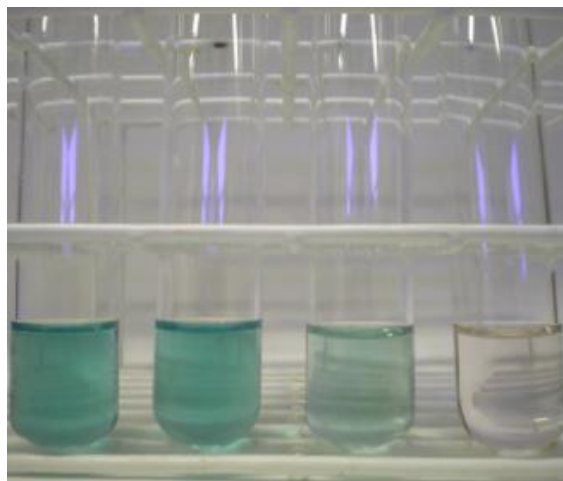


Figura 10 – Diferentes níveis de inibição do catião ABTS³⁸ (da esquerda para a direita verifica-se um aumento da atividade antioxidante).

A inibição do ABTS é calculada em percentagem através da fórmula:

$$\% \text{ Inibição do radical ABTS} = \frac{\text{Abs (controlo)} - \text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (controlo)}} * 100$$

O controlo é feito medindo a absorvância da solução de trabalho ABTS.

1.5.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método da redução do Ferro (FRAP)

O FRAP é, também, um método largamente utilizado e simples para determinar a atividade oxidante de determinado composto. Esta metodologia mede a capacidade dos compostos antioxidantes de reduzirem o ião Fe³⁺ para Fe²⁺ (figura 11).

Este método é realizado a pH baixo utilizando um complexo de ferro e TPTZ. Quando este complexo é reduzido, surge uma cor azul intensa com absorção máxima nos 593 nm³⁹. Neste caso, o agente redutor seria o composto antioxidante em estudo e a absorvância é proporcional à capacidade antioxidante³⁹.

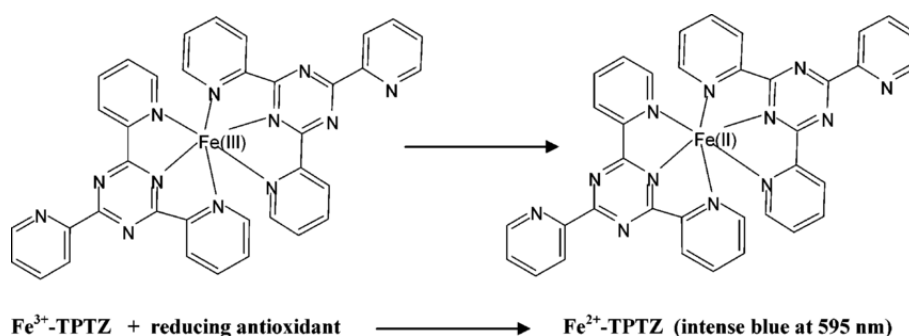


Figura 11 – Reação de redução do complexo Ferro – TPTZ⁴⁰.

Este método foi originalmente aplicado em plasma, mas começou também a ser aplicado a outros compostos, como fluidos biológicos, plantas e extratos³⁹.

1.6 Quitina e Quitosano

A quitina (figura 12) é um polissacarídeo com monómeros 2-acetoamido-2-deoxi- β -D-glucose interligados pela ligação β (1-4)⁴¹. É, também, o segundo polímero mais abundante na natureza⁴², sendo o componente mais abundante do exoesqueleto de invertebrados, moluscos e das paredes celulares de fungos⁴¹. É biodegradável, não tóxico, é biocompatível com tecidos e órgãos de animais e plantas, podendo ser processado para formar fibras, géis, membranas e esponjas⁴³, e, por isso, tem aplicações na indústria alimentar e farmacêutica⁴¹.

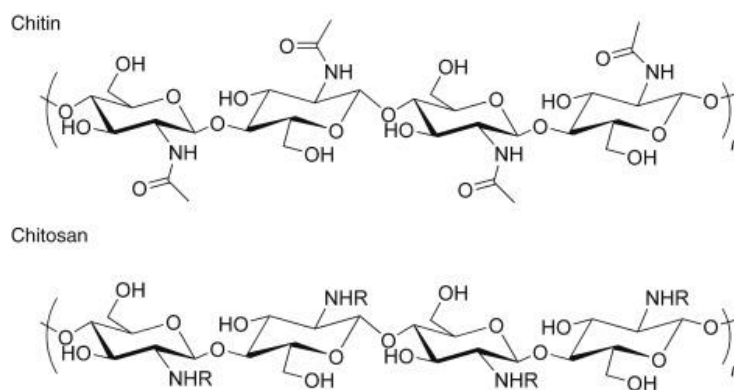


Figura 12 – Estrutura química da quitina (em cima) e do quitosano (em baixo)⁴².

O processo de obtenção de quitosano dos crustáceos, normalmente, passa por três fases: desmineralização, desproteínização, e desacetilação⁸. Além disso, para o quitosano ser extraído com o maior grau de pureza possível, as cascas dos crustáceos têm de passar por um processo que envolve a sua lavagem, secagem e moagem⁴⁴.

O processo de desmineralização consiste na remoção de minerais, no caso das cascas de camarão, o carbonato de cálcio, que é o mineral presente em maior quantidade, como referido no subcapítulo 1.2.1. Este processo pode ser realizado utilizando ácidos orgânicos ou inorgânicos, sendo o mais utilizado o ácido hidrocloreídrico diluído, ainda que outros ácidos como ácido acético ou cítrico possam ser utilizados⁴⁴.

A desproteínização é o processo em que as ligações químicas entre a quitina e as proteínas da casca é quebrada, utilizando uma solução básica, sendo que a solução

de hidróxido de sódio (NaOH) tem sido a mais utilizada e a que apresenta melhores resultados⁴⁴.

A desacetilação consiste na conversão de quitina em quitosano (figura 13). O quitosano é um composto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável⁴⁵. Este processo pode ser feito com recurso a reações ácidas ou básicas, no entanto, a desacetilação básica é a preferida pois não danifica as ligações glicosídicas⁴⁴. O quitosano é solúvel em soluções ácidas⁴¹.

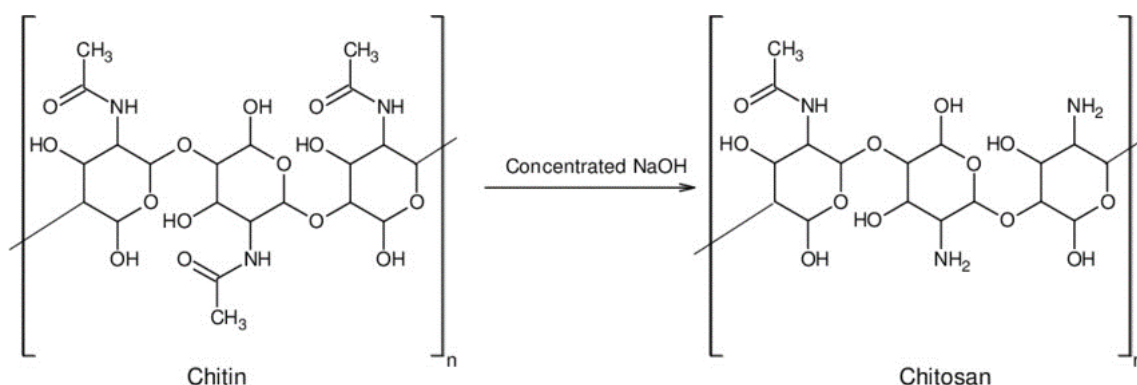


Figura 13 – Reação de conversão de quitina em quitosano⁴⁶.

O grau de desacetilação (GD) é utilizado para determinar a quantidade de grupos amino (NH₂) nos polissacarídeos, permitindo assim determinar a quantidade de quitina e quitosano presentes⁴⁷. A quitina, quando apresenta GD superior a 75% é denominada quitosano⁴⁷, e, por isso, este valor é importante, dado que as propriedades físicas, químicas e biológicas irão variar conforme o GD⁴⁸.

Existem diversos métodos para a determinação do GD, como espectroscopia UV-Vis, ressonância magnética nuclear ou espectroscopia UV da primeira derivada⁴⁸.

1.7 Filmes baseados em biopolímeros

A produção mundial de materiais de polímeros, ou plásticos, baseados em petróleo, ronda os 400 milhões de toneladas anuais, sendo que cerca de 40% desta quantidade correspondia a plásticos de uso único. No entanto, nos últimos anos, a sua produção tem vindo a ser proibida em diversos países⁴⁹.

O uso extensivo destes polímeros, que não são biodegradáveis, apresenta um problema ambiental, pois são produzidas grandes quantidades de lixo que acabam em aterros ou até mesmo no mar. Os polímeros baseados em petróleo também não

podem ter incorporados em si compostos bioativos, o que no caso de embalagens de alimentos é uma desvantagem relativamente aos filmes de biopolímeros⁵⁰.

Os filmes baseados em biopolímeros são uma alternativa aos plásticos convencionais, sendo naturais e renováveis, contrariamente aos polímeros baseados em petróleo⁴⁹, tais como polietileno tereftalato (PET) (figura 14) ou policloreto de vinilo (PVC).



Figura 14 – Garrafas de água fabricadas com plástico PET, um dos plásticos mais utilizados a nível mundial.

O desenvolvimento de embalagens produzidas a partir de biopolímeros é uma indústria promissora e que tem como objetivo reduzir a produção do desperdício de plásticos e diminuir a emissão de gases com efeito de estufa⁴⁹. Além disso, os biopolímeros têm potencial para substituir os plásticos convencionais devido à sua não toxicidade, biocompatibilidade e capacidade de degradação rápida⁴⁹.

Os filmes com base em biopolímeros podem ter origem em vários compostos renováveis, como celulose, quitosano, proteínas ou agarose. Além disso, é possível incorporar agentes antimicrobianos e com atividade antioxidante nestes o que representa uma vantagem enorme para aplicações alimentares, por exemplo⁵⁰.

Contudo, os filmes de biopolímeros apresentam algumas limitações, como por exemplo, na maioria das vezes são solúveis em água e não são tão resistentes como os plásticos comuns⁴⁹.

Desta forma, há interesse em otimizar os filmes de biopolímeros, tornando-os mais resistentes e com características semelhantes ao plástico convencional, tendo ainda a vantagem de poderem ter incorporados compostos ativos, como compostos antioxidantes e antimicrobianos ou nanopartículas, por exemplo⁵⁰.

2. Objetivos

Neste trabalho experimental recorreu-se a diferentes técnicas de extração para extrair das cascas de camarão compostos bioativos com potencial atividade antioxidante de forma a valorizar este resíduo e a acrescentar valor aos seus constituintes. Para tal foram testadas várias técnicas de extração e diferentes solventes e a sua eficiência avaliada através da aplicação de diferentes métodos colorimétricos, tais como TPT, TCT e avaliação da atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP.

Paralelamente, pretendeu-se extrair do excedente sólido das extrações em água em condições subcríticas quitina e a sua respetiva transformação em quitosano para a produção de um filme com potencial aplicação para produção de embalagens para conservação de alimentos.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nos trabalhos experimentais realizados encontram-se na lista seguinte:

- 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Sigma-Aldrich)
- Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (Fluka)
- Ácido acético glacial (VWR Chemicals)
- Ácido ascórbico (Riedel-de-Haën)
- Ácido cítrico (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorídrico (Honeywell Fluka)
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich)
- Água ultrapura (Milipore)
- Brometo de potássio
- Cloreto de ferro (III) hexahidratado
- Etanol absolute (Carlo Erba)
- Glicerol (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sódio
- Metanol (Fisher Chemical)
- Persulfato de potássio (Sigma-Aldrich)
- Quitina comercial (Sigma-Aldrich)
- Quitosano comercial (Sigma-Aldrich)
- Reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich)
- Tampão acetato

3.2 Preparação das amostras

As cascas de camarão utilizadas foram cedidas pela empresa Mar Cabo. Estas foram desidratadas e secas no forno a 100°C, seguido de um processo de trituração e embalagem, em vácuo. Foram armazenadas em local seco e protegido da luz.

Após as cascas de camarão serem submetidas às extrações, o líquido obtido foi filtrado e o sólido seco obtido foi seco na estufa a 100°C.

3.3 Métodos de extração de compostos bioativos

3.3.1 Extração convencional

Para avaliar a possibilidade de recuperar compostos antioxidantes da casca de camarão testou-se uma extração convencional baseada no método descrito por Nunes *et al.*⁹ com ligeiras modificações. Para isso, 1,5 g de casca de camarão foram misturados com 30 mL de solvente (água ou etanol ou etanol: água 50:50) e colocados num banho-maria a uma temperatura de 40°C durante 20 minutos. Após isso, os extratos foram filtrados por gravidade e o extrato recolhido e armazenado a -20°C até posterior análise.

3.3.2 Extração assistida por ultrassons

A extração assistida por ultrassons foi igualmente testada para avaliar a sua eficiência de remoção dos compostos bioativos. De acordo com estudos descritos na literatura¹⁴, diferentes condições foram testadas e que se encontram descritas na Tabela A1 (em anexo). Após a extração, os extratos foram filtrados por gravidade e o extrato recolhido e armazenados em frascos a -20°C até posterior análise.

3.3.3 Extração subcrítica com água

A extração subcrítica com água foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Koomyart *et al.*⁵¹, com algumas alterações. Para isso, usaram-se cerca de 7,5 g de casca camarão com 150 mL de água, tendo-se testado três temperaturas diferentes (100°C, 150°C e 200°C) durante 20 minutos. Para efeitos comparativos com as restantes extrações testadas, efetuou-se a extração com uma mistura etanol: água 50:50, com o intuito de verificar se seria mais eficiente que as técnicas anteriores. Após a extração, os extratos foram filtrados por gravidade e o extrato recolhido e armazenado a -20°C até posterior análise.

3.4 Determinação do teor de polifenóis e carotenoides totais e atividade antioxidante

3.4.1 Determinação do TPT

O TPT foi determinado através do método descrito por Dorosh *et al.*⁵². Os extratos foram analisados numa microplaca de 96 poços. Em cada poço foram colocados 25 µL

de água ultrapura (branco), ou solução padrão (ácido gálico) ou extrato, 75 mL de água ultrapura e 25 mL de reagente Folin-Ciocalteu (FC) (1:1). A placa foi reservada no escuro durante 6 minutos. Depois, adicionou-se 100 mL de carbonato de sódio (75 g/L) a cada poço. A placa foi colocada no escuro durante 90 minutos e ao fim deste tempo a absorvância foi medida a 760 nm num leitor de microplacas (Multi Mode Microplate Reader (leitor de placas LP), Biotek, SynergyTM HT W/TRF (Model Number SIAFRT; Serial Number: 267577)) após 10 segundos de agitação média.

A curva de calibração foi preparada usando o padrão de ácido gálico numa gama de concentrações de 10 a 150 mg/L. Todas as análises foram realizadas em triplicado. Os resultados estão expressos em mg de EAG/g de casca de camarão.

3.4.2 Determinação do TCC

Para a execução deste método, os extratos foram analisados diretamente seguindo o procedimento descrito por Stengel *et al*⁵³. Pipetou-se 300 µL de cada extrato para uma microplaca de quartzo de 96 poços. A absorvância foi medida a dois comprimentos de onda diferentes: a 480 nm e a 750 nm no leitor de microplacas. Todas as análises foram realizadas em triplicado. Para o cálculo do TCC, utilizou-se a seguinte fórmula de cálculo:

$$C(\mu\text{g/mL}) = 4 * (Abs_{480} - Abs_{750})$$

Os resultados foram expressos em µg de carotenoides por g de amostra seca.

3.4.3 Determinação do poder redutor pelo método FRAP

A determinação do poder redutor pelo método FRAP foi efetuado seguindo o procedimento descrito por Dorosh *et al*⁵³. A solução de trabalho FRAP foi preparada misturando 30 mL de tampão acetato (300 mmol/L), 3 mL de solução TPTZ (10 mmol/L em solução de HCl 40 mmol/L) e 3 mL de FeCl₃·6H₂O (20 mmol/L). Para a análise, numa microplaca de 96 poços, foram adicionados 20 µL de cada extrato ou solução padrão (ácido ascórbico) a 180 µL do reagente FRAP. A placa foi colocada no leitor de microplacas, onde ficou a incubar durante 10 minutos a 37°C e a absorvância foi medida a 593 nm após 30 segundos de agitação média.

A curva de calibração foi preparada utilizando uma solução padrão de ácido ascórbico com concentrações entre 5 e 100 mg/L. Todas as análises foram realizadas em

triplicado. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido ascórbico por g de casca de camarão (mg EAA/g cc).

3.4.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

A capacidade dos extratos obtidos para inibir o radical ABTS foi determinada seguindo o procedimento descrito por Carvalho *et al*⁵⁴.

De forma a determinar a atividade antioxidante por este método foi necessário preparar uma solução de trabalho ABTS. Para isso, começou por se utilizar o reagente ABTS para se preparar uma solução aquosa 7 mM. Depois, preparou-se uma solução de persulfato de potássio 2,45 mM. Ambas as soluções foram preparadas com água ultrapura. Após a preparação das mesmas, quantidades iguais destas soluções (10 mL) foram adicionadas a um frasco e deixou-se a reagir por 16 horas no escuro. Prosseguindo para a preparação da solução de trabalho ABTS, 5 mL da solução que esteve a reagir anteriormente foi filtrada com um filtro de nylon e adicionou-se 100 mL de água ultrapura. Mediu-se a absorvância a 734 nm, que deveria estar compreendida entre 0,698 e 0,702, e ajustou-se para a absorvância desejada.

Para a análise, colocaram-se 20 µL de padrão ou extrato numa microplaca de 96 poços e 180 µL de solução de trabalho de ABTS. Após incubar 6 minutos no escuro, a placa agitou durante 30 segundos a velocidade média e a absorvância foi medida a 734 nm no leitor de microplacas. A curva de calibração foi preparada utilizando uma solução padrão de ácido ascórbico com concentrações entre 5 e 100 mg/L. Todas as amostras foram analisadas em triplicado e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido ascórbico por g de casca de camarão (mg EAA/g cc).

3.5 Processos de desmineralização, desproteínização e desacetilação da casca de camarão para obtenção de quitosano.

Estas reações foram otimizadas com base nos métodos sugeridos por Hosney *et al*.⁴⁴ e foram feitas nas cascas de camarão e nos extratos da extração subcrítica com água a 200°C, de forma a ser possível comparar a presença de quitina em cada um dos extratos.

Para remover o carbonato de cálcio das cascas de camarão e dos extratos das cascas de camarão da ESA (desmineralização), misturou-se 10 g de cascas com 150 mL de uma solução de ácido cítrico 2 M durante 48 horas.

Após a reação ter ocorrido, neutralizou-se as soluções utilizando água destilada quente, seguido de uma filtração a vácuo. Por fim, secou-se o produto filtrado durante 2 horas na estufa a 100°C.

Para o processo de desproteínização, preparou-se uma solução de NaOH 1,5 M. Esta solução foi adicionada às cascas e a mistura foi colocada a reagir durante uma hora a 60°C, com agitação. Depois, fez-se uma filtração a vácuo, utilizando água quente, que foi adicionada até se atingir pH neutro.

Na desacetilação, por cada grama de casca utilizaram-se 50 mL de solução de NaOH 50%. A mistura foi colocada a reagir durante 4 horas a uma temperatura de 90°C. De seguida, esta foi filtrada a vácuo, utilizando água quente, até se obter pH neutro.

O sólido obtido (figura 15) foi então seco na estufa a 100°C, pesado numa balança analítica e reservado até uso posterior.

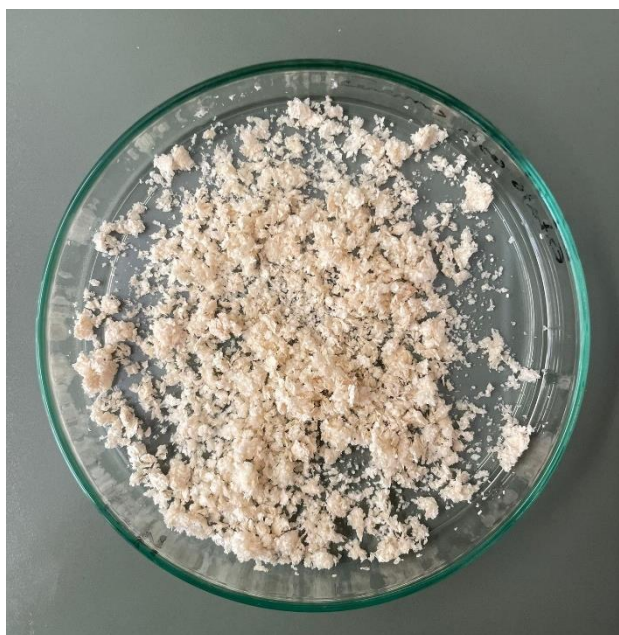


Figura 15 - Cascas de camarão após as reações de desmineralização, desproteínização e desacetilação.

3.6 Determinação da presença de quitina e quitosano através da espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

As amostras de quitina e quitosano foram caracterizadas por FTIR. Para isso foi necessário preparar pastilhas com cerca de 5% do extrato e 95% de KBr.

Prepararam-se também amostras de quitina e quitosano comercial para analisar por FTIR e comparar com os extratos obtidos neste trabalho. Os espectros de FTIR foram obtidos num espectrómetro Jasco FTIR 460 Plus. Todos os espectros foram realizados à temperatura ambiente, na faixa de comprimentos de onda entre os 400-4000 cm^{-1} usando uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varrimentos.

3.7 Determinação da quantidade de quitina e quitosano por espectroscopia Ultravioleta-Visível

De forma a garantir a presença de quitina e quitosano nas cascas de camarão após o tratamento referido no subcapítulo 3.5 e calcular a concentração de quitosano, foi aplicada espectroscopia UV-Vis com recurso à primeira derivada.

Para a determinação dos espectros, começou-se por se preparar uma solução 0,1 M de ácido acético para se dissolver 10 mg de cascas de camarão e 10 mg de extrato em dois balões volumétricos de 10 mL com esta mesma solução, segundo o método sugerido por Hao *et al.*⁵⁵. Como controlo foi preparada uma solução de quitosano comercial nas mesmas as condições.

O branco foi feito com água e procedeu-se à leitura das soluções preparadas entre os 200 e 400 nm.

Para a curva de calibração, foram preparadas cinco soluções de N-acetilglucosamina (GlcNAc) com concentrações compreendidas entre os 0,005 mg/mL e 0,05 mg/mL, utilizando ácido acético 0,01M como solvente. De seguida, determinaram-se os valores da primeira derivada, conforme descrito por Tan *et al.*⁴⁸. Estes valores serão utilizados para a determinação do *zero crossing point*.

A utilização deste composto deve-se ao facto de o quitosano ser um composto derivado da GlcNAc.

Todas as medições foram feitas em triplicado.

3.7.1 Determinação do zero crossing point

Foram preparadas três soluções de ácido acético de concentrações 0,01M, 0,02M e 0,03M e obteve-se o espectro UV-Vis para as mesmas, seguida da determinação dos valores da primeira derivada de cada um destes espectros.

3.8 Preparação dos filmes com quitosano extraído das cascas de camarão

Para se preparar os filmes, várias condições foram testadas com base nos métodos sugeridos por Eulálio *et al.*⁵⁶. Pesou-se 1 g de quitosano, tanto do obtido a partir das cascas de camarão, como de quitosano obtido através da ESA, ao qual foi adicionado uma solução de 100 mL de ácido acético. A mistura ficou em agitação durante 48 horas a temperatura ambiente para dissolver o quitosano. Como agente plastificante, foi adicionado glicerol.

As condições testadas estão apresentadas na Tabela 1; foram avaliadas a concentração da solução de ácido acético (1 e 2% v/v) e a quantidade de glicerol (0; 0,1 e 0,3 % m/v).

Tabela 1 – Diferentes condições de preparação dos filmes de quitosano.

Filme	Condições de preparação		
	Tipo de quitosano utilizado	Conc. da solução de ácido acético (%)	Quantidade de glicerol adicionado (g)
1	Comercial	1%	0
2	Comercial	1%	0,3
3	Direto das cascas	1%	0,3
4	Obtido na ESA a 200°C	2%	0,1
5	Obtido na ESA a 200°C	2%	0,3
6	Obtido na ESA a 200°C	1%	0,3

A solução filmogénica foi colocada em moldes de silicone (10 x 3 cm, diâmetro*altura), e seca numa estufa com circulação de ar [(JPSelecta, Modelo 20002), vórtex (Heidolph, Reax Top, Schwabach, Alemanha)] a 50°C, durante 16 horas.

Os filmes desenvolvidos foram caracterizados relativamente ao teor de humidade, solubilidade, espessura, propriedades mecânicas e óticas.

Como foi obtida uma quantidade pequena de quitosano a partir das cascas de camarão, só foi possível realizar um ensaio para cada uma das condições descritas na Tabela 1.

3.8.1 Humidade

A humidade dos filmes foi determinada em triplicado numa balança de humidade (KERN MLS50 160–3 Infra Red analyser). Os resultados foram expressos em %.

3.8.2 Capacidade de retenção de água

Para a avaliação da capacidade de retenção de água (“Water Holding Capacity”, WHC) foram cortadas amostras dos vários filmes com 2 cm de diâmetro e registada a respetiva massa. De seguida, os filmes estiveram em contacto com água destilada (10 mL) por 24 h, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Findo este período, os filmes foram retirados da água, o excesso de água foi absorvido com papel absorvente, e determinou-se a massa final dos filmes. Para cada tipo de filme, o ensaio foi realizado em duplicado e foi calculada a média e o desvio padrão.

3.8.3 Solubilidade

Para a determinação da solubilidade, os filmes foram cortados em formato de círculos de aproximadamente 2 cm de diâmetro, secos numa estufa a 105°C, e após avaliada a massa inicial foram colocados num matraz em contacto com 10 mL de água, por 24 h à temperatura ambiente. Findo este período, o filme foi retirado da solução, seco em estufa a 105 °C e avaliada a massa final. Para cada tipo de filme, o ensaio foi realizado em duplicado e foi calculada a média e o desvio padrão.

$$\text{Solubilidade / WHC (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{inical}} - \text{massa}_{\text{final}}}{\text{massa}_{\text{inical}}} * 100$$

3.8.4 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada com recurso a um micrómetro digital (Mitutoyo, 0.01 mm, Japan), com uma precisão de 0,001 mm. Foram feitas doze medições em diferentes pontos aleatórios dos filmes, e foi calculada a média destes valores.

3.8.5 Propriedades mecânicas

As amostras dos filmes de tamanho 3 x 6 cm² foram analisadas no equipamento Autograph AGS-X da Shimadzu, de acordo com o método padrão (ASTM D882). As amostras foram submetidas a uma tração com velocidade de 0,5 mm/s e a separação das garras foi fixa nos 4,5 cm, obtendo-se os valores máxima tensão (em kPa e Mpa), a capacidade elástica (N/mm²), a percentagem de máxima deformação.

3.8.6 Opacidade e capacidade da barreira UV

Para a determinação da opacidade dos filmes e da sua capacidade da barreira UV, colocou-se uma tira de filme numa cuvete de quartzo e mediu-se a abs entre os 200 e os 700 nm.

A área sob a curva entre 200 e 400 nm, expressa em unidades de absorbância por nanómetro (UA x nm), estima a capacidade de barreira UV-vis dos filmes. A opacidade foi calculada dividindo o valor da abs a 600 nm pela espessura média do filme.

4. Resultados e Discussão

4.1 Comparação das técnicas de extração testadas

4.1.1 Teor de polifenóis total

De acordo com a Tabela A2 (em anexo), o TPT dos extratos varia entre $0,51 \pm 0,02$ (amostra 11; EAU com ácido cítrico) e $5,43 \pm 0,17$ (amostra 9; ESA com 50% etanol a 200°C) mg EAG/g cc.

Como é possível observar pela análise da figura 16, os valores de TPT mais elevados foram obtidos para a extração subcrítica, mais precisamente quando foi utilizada a temperatura mais elevada (200°C), independentemente do solvente usado (água ou etanol 50%) uma vez que os teores de fenólicos recuperados foram semelhantes.

De acordo com o descrito na literatura, o metanol é considerado um solvente relativamente eficiente na recuperação de compostos antioxidantes das cascas de camarão devido à sua polaridade⁵⁷. No entanto, como se pode verificar pela análise da figura 16, o TPT obtido para os extratos da subcrítica foi similar ou superior, indicando que esta tecnologia poderá ser uma forma mais eficiente e sustentável de recuperar os compostos bioativos das cascas de camarão. Estes resultados seriam de certo modo esperados, uma vez que a constante dielétrica da água baixa de 80 (temperatura ambiente) para 27^{58} quando esta se encontra a temperatura subcrítica adquirindo propriedades similares á do solvente metanol⁵⁷. Deste modo seria expectável que os TPT obtidos fossem similares aos reportados usando solventes orgânicos nas extrações.

Das técnicas de extração testadas, a EAU mostrou-se pouco eficiente na extração de compostos fenólicos da casca de camarão, mesmo comparando com a EC. Os resultados obtidos por EAU podem estar relacionados com as condições de extração, nomeadamente solvente, razão massa/volume, temperatura e tempo de extração testados, que poderão não ter sido as mais adequadas para a remoção de compostos fenólicos da casca de camarão.

Comparando o TPT obtido em todas as condições testadas, é possível concluir que a extração subcrítica com água a 200°C (tanto utilizando água ou etanol 50% como solvente) foi a que, no geral, apresentou resultados mais elevados, mostrando-se, desde já, promissora.

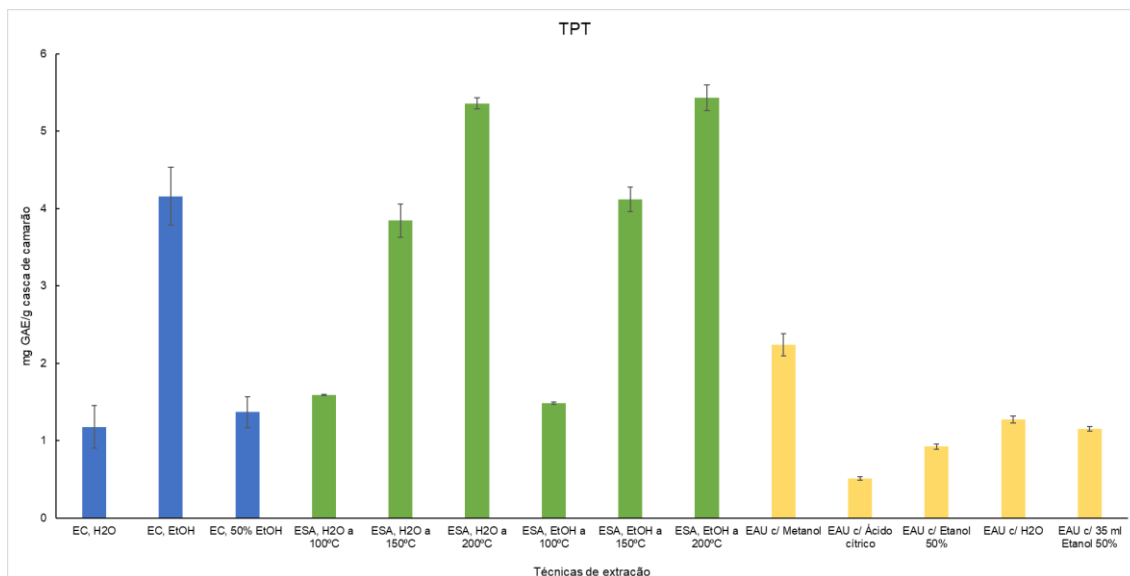


Figura 16 – Teor de polifenóis total para os extratos de casca de camarão; resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/g casca camarão, média $\pm$ desvio padrão, $n=3$.

Maia *et al*²². Também realizaram EC em cascas de camarão, utilizando etanol como solvente. O valor de TPT variou entre 4,7 e 10,4 mg/EAG, dependendo de fatores como a espécie de camarão, a estação do ano e o local onde os camarões foram recolhidos.

Estes resultados são superiores aos obtidos neste trabalho experimental, que foram de $4,159 \pm 0,374$ mg/EAG (amostra 2; EC com EtOH), assim como superiores aos valores da ESA tanto com água como 50% etanol. Esta diferença poderá dever-se ao tempo de extração, que foi de 2h no trabalho realizado por Maia *et al*, enquanto nas condições estudadas foi apenas de 20 minutos para a EC e 15 minutos para a ESA.

4.1.2 Teor de carotenoides total

De acordo com a Tabela A2 (em anexo), o TCT dos extratos varia entre $0,82 \pm 0,04$ (amostra 2; EC com etanol) e $59,9 \pm 1,0$ (amostra 6; ESA com água a 200°C) μg carotenoides/g cc.

Tal como reportado anteriormente para o TPT, a extração subcrítica, nomeadamente a 200°C, permitiu obter os teores de carotenoides mais elevados, independentemente do solvente extrator aplicado. De acordo com os dados obtidos, foi ainda possível verificar que o valor de TCT aumentou linearmente conforme o aumento da temperatura de extração utilizada. Esta diferença poderá estar relacionada com o

aumento da solubilidade dos carotenoides em água, assim como no aumento da transferência de massa, resultando numa extração mais eficiente⁵⁹.

No caso da EAU, como se pode verificar na figura 17, o TCT foi mais elevado para os extratos preparados com metanol, tal como era esperado⁵⁷. No entanto, quando se compara com a extração subcrítica a 200°C, os teores são mais baixos permitindo demonstrar a potencialidade da ESA para a recuperação dos compostos bioativos da casca de camarão e posterior aplicação noutros produtos.

No caso da EC, foi a técnica de extração testada menos eficiente, com valores de TCT a variar entre 0.82 ± 0.04 e 9.04 ± 0.17 μg carotenoides/g cc.

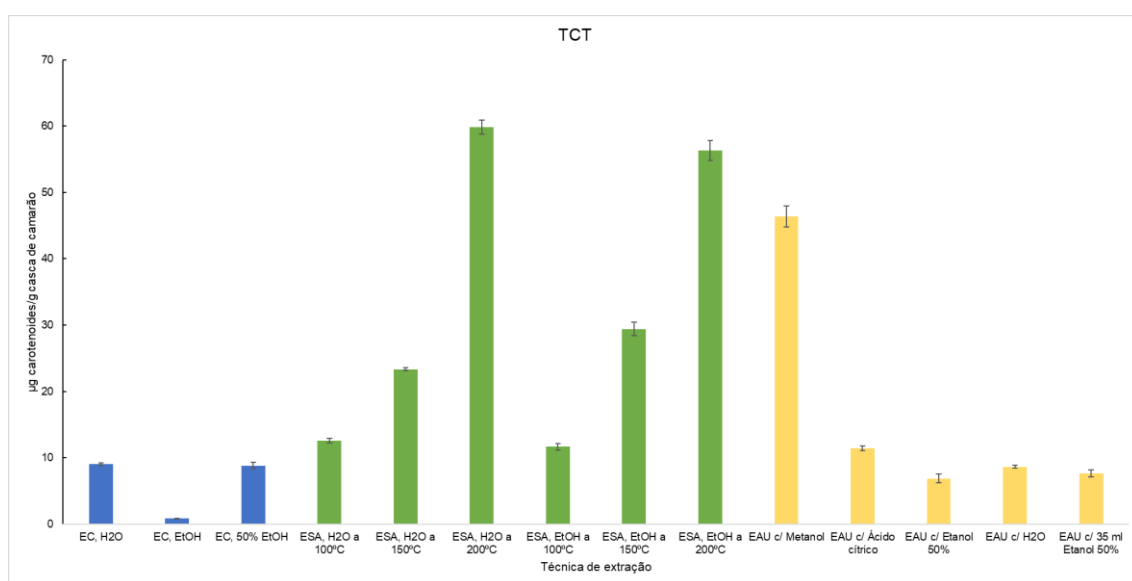


Figura 17 – Teor de carotenoides total para os extratos da casca de camarão; resultados expressos em μg de carotenoides/g de casca camarão, média $\pm$ desvio padrão, $n=3$.

Com isto, a ESA mostrou ser o método de extração mais eficaz na extração dos carotenoides.

No estudo feito por Maia *et al*.²², foram obtidos valores de TCT que variaram entre 32 e 134 μg carotenoides/g cc. Estes valores são muito superiores aos obtidos neste trabalho experimental, mesmo comparativamente à ESA a 200°C, o que, mais uma vez, poderá dever-se ao tempo de extração em que estas foram feitas.

Já no estudo feito por López *et al*.⁶⁰, o TCT em nas cascas variou entre 8,27 e 9,16 μg carotenoides/g cc. A extração foi feita por EC utilizando uma mistura 1:1 de etanol e acetona. Mais uma vez, estes resultados são superiores ao obtidos neste trabalho

experimental, o que, neste caso, se poderá dever à utilização de uma mistura com solventes orgânicos.

Ainda segundo Maia *et al.*²², quando há um aumento do valor do TCT, verifica-se que há maior quantidade de astaxantina presente nos extratos. Este facto comprova que a quantidade de carotenoides nas cascas de camarão é diretamente influenciada pela quantidade de astaxantina presente nas mesmas. Deste modo, seria necessária uma análise mais detalhada, como HPLC, para determinar quais carotenoides, e a sua quantidade exata, estão presentes.

4.1.3 Atividade antioxidante determinada pelo método ABTS

De acordo com a Tabela A2 (em anexo), a atividade antioxidante determinada pelo método ABTS varia entre $0,177 \pm 0,007$ (amostra 2; EC com etanol) e $7,93 \pm 0,01$ (amostra 9; ESA com 50% etanol) mg EAA/g casca de camarão.

Das técnicas de extração testadas, a EC revela valores de atividade antioxidante mais baixos, principalmente para quando foram usados solventes orgânicos como solventes extratores. Estes resultados poderão dever-se ao tipo de compostos presente em cada um dos extratos, uma vez que diferentes compostos exibem propriedades antioxidantes diferentes. No caso da EAU, também se verificou que a atividade antioxidante é mais elevada para os extratos aquosos, o que poderá mais uma vez dever-se ao tipo de compostos que fazem parte da composição do extrato. Deste modo, no futuro seria importante determinar a composição fenólica dos extratos.

A ESA mostrou os melhores resultados a temperaturas mais elevadas, tal como reportando anteriormente para os restantes métodos, demonstrando a correlação entre o teor de polifenóis e a atividade antioxidante já reportada por outros autores²².

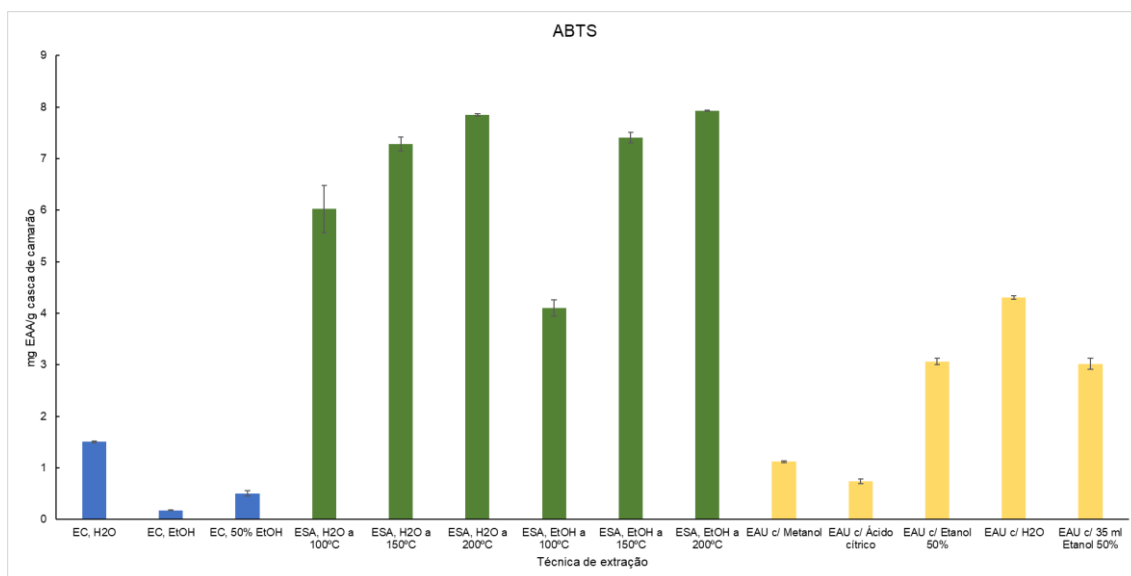


Figura 18 – Atividade antioxidante determinada pelo método de inibição de radicais pelo catião ABTS; resultados expressos em mg de equivalentes ácido ascórbico/g de casca camarão, média $\pm$ desvio padrão, $n=3$.

Lira *et al.*⁶¹ também fizeram extração de compostos antioxidantes utilizando etanol como solvente, utilizando um liquidificador durante 5 minutos. Esta técnica permitiu obter uma taxa de inibição de 45,23%. Contudo, não é possível comparar diretamente os valores obtidos pois são utilizados padrões de quantificação diferentes.

4.1.4 Atividade antioxidante determinada pelo método FRAP

De acordo com a Tabela A2 (em anexo), a atividade antioxidante determinada pelo método FRAP varia entre $0,074 \pm 0,005$ (amostra 7; ESA com 50% etanol a 100°C) e $4,35 \pm 0,31$ (amostra 9; ESA com 50% etanol a 200°C) mg EAA/g casca de camarão.

Tal como verificado anteriormente para os restantes métodos usados para a caracterização dos extratos, a ESA a 200°C foi a condição de extração que se revelou mais eficiente. No entanto, para a maioria das condições testadas, independentemente da técnica de extração usada, os valores de atividade antioxidante determinada pelo método FRAP foram baixos demonstrando que, possivelmente, a maioria dos compostos presentes nos extratos possuem uma baixa capacidade para reduzir o ferro. No entanto, deve-se destacar o valor obtido por EAU quando se usou etanol 50% com uma razão massa/volume diferente (35 mL de solvente), o que demonstra que no futuro seria ainda importante aprofundar ainda mais a influência de alguns dos parâmetros de extração.

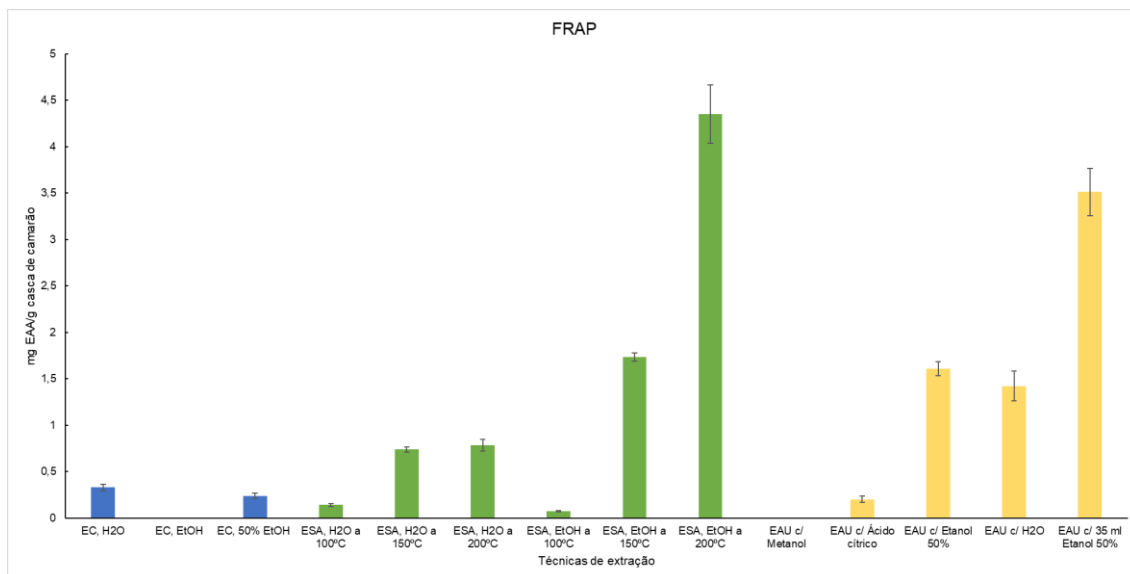


Figura 19 – Atividade antioxidante determinada pelo método FRAP; resultados expressos em mg de equivalentes ácido ascórbico/g de casca camarão, média $\pm$ desvio padrão, $n=3$.

Para valores de FRAP, Maia *et al.*²² reportam valores entre os 3 e os 7 mg EAA/ g de cc que se mostram inferiores aos obtidos neste trabalho experimental. Já Lira *et al.*⁶¹ demonstraram um valor de FRAP de 0,338 mg EAA/ g de cc, que vai de encontro ao valor obtido na amostra 1 (EC com água).

Lira *et al.*⁶¹ também demonstraram uma correlação entre o tratamento dos extratos com temperatura e a atividade antioxidante obtida, verificando que tanto esta, como o teor de carotenoides, diminuía com o aumento da temperatura. Contudo, este decréscimo causado pela temperatura não se verificou no método ABTS.

Já Maia *et al.*²² verificaram que o aumento do TPT resulta num aumento dos valores de FRAP, indicando que os compostos fenólicos contribuem positivamente para o poder antioxidante.

Assim sendo, comprava-se a importância da otimização dos métodos de extração para maior obtenção de compostos bioativos das cascas de camarão, seja por otimização do tempo de extração, do solvente utilizado e da temperatura aplicada.

De acordo com os resultados anteriores, pode-se concluir que a ESA se revelou mais eficiente, tendo-se destacado em todos os ensaios a amostra 9 (ESA com etanol 50% a 200°C) com valores de compostos fenólicos e carotenoides totais de 5.43 ± 0.17 mg GAE/g casca de camarão e 56.3 ± 1.5 μ g carotenoides/g casca de camarão, e de

atividade antioxidante determinada pelos métodos ABTS e FRAP de 7.93 ± 0.01 e 4.35 ± 0.31 mg EAA/g casca de camarão. Estes valores representam cerca de cinco vezes os valores obtidos na EC, demonstrando a potencialidade da extração subcrítica na recuperação de compostos antioxidantes das cascas de camarão ainda que seja necessária uma otimização dos parâmetros de extração.

Contudo, apesar dos resultados promissores da extração subcrítica comparativamente às restantes técnicas de extração testadas, os extratos obtidos possuíam um aroma característico que limitava a potencial aplicação destes a produtos alimentares e ou cosméticos. Deste modo, na etapa seguinte do trabalho testou-se a possibilidade de incorporar estes extratos na preparação de um filme, cujos resultados obtidos serão discutidos no subcapítulo 4.2.

4.2 Espectro FTIR das cascas de camarão e dos extratos obtidos da ESA a 200°C

Como referido no subcapítulo 1.1.2, as cascas de camarão são, também, ricas em quitina, que pode ser convertido em quitosano. Devido ao elevado potencial deste composto, nesta etapa do trabalho testou-se a possibilidade de extrair o quitosano e a viabilidade de preparar um filme com propriedades únicas associadas usando as cascas de camarão como matéria-prima.

Utilizando as cascas de camarão, sem qualquer tratamento e os extratos sólidos da ESA a 200°C, o quitosano foi obtido após os processos de desmineralização, desproteinização e desacetilação, descritas no subcapítulo 3.5. Para determinar a presença de quitosano foram traçados os espectros FTIR entre os 400 e 4000 cm^{-1} e os resultados estão apresentados na Figura 20.

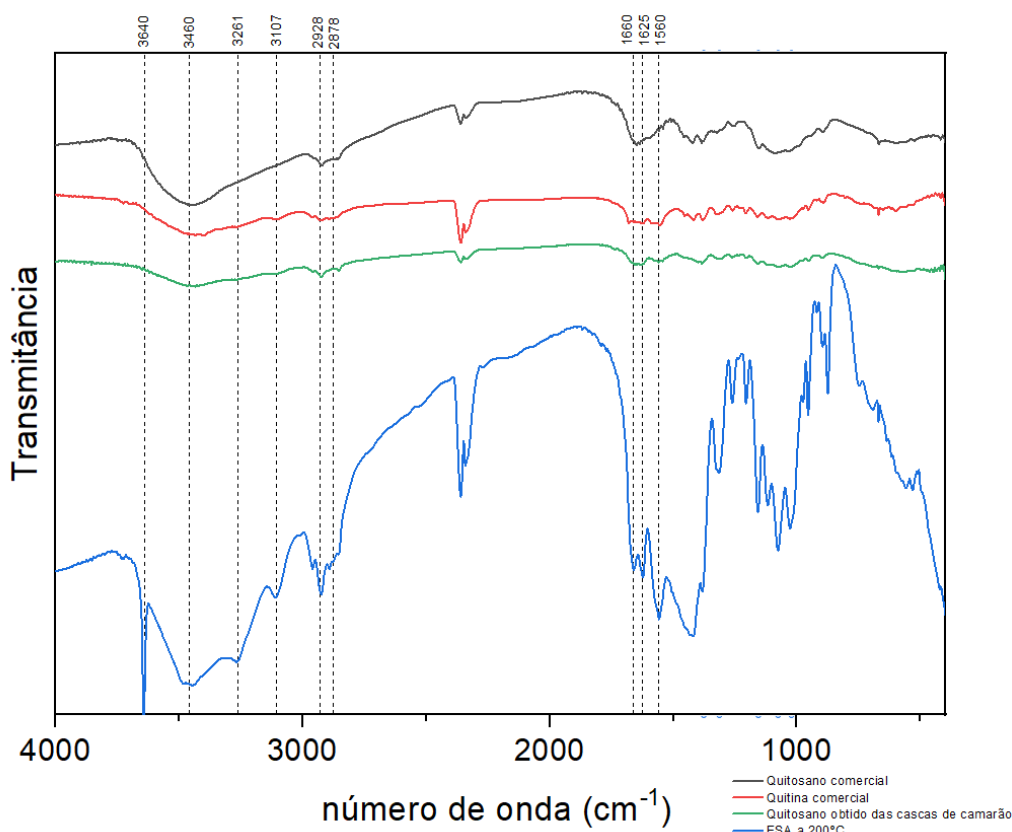


Figura 20 – Espectros de FTIR obtidos para o quitosano comercial, quitina comercial, quitosano extraído diretamente das cascas e quitosano obtido a partir da ESA a 200°C.

Os espectros FTIR da figura 20 foram comparados com os valores tabelados⁶², e com espectros de FTIR de quitosano obtido de cascas de camarão e já descritos na literatura.

O gráfico azul apresenta uma banda estreita por volta dos 3640 cm^{-1} , o que poderá indicar a presença de grupos -OH livres. Esta mesma banda não se verifica nos restantes espectros.

Há também uma banda por volta de 3460 cm^{-1} comum a todos os espectros, que indica a presença de grupos -OH, nomeadamente em polímeros, o que se confirma dada a natureza do quitosano, assim como de aminas primárias⁶³. Os restantes picos entre os 3550 e 3200 cm^{-1} indicam a presença de outros grupos -OH e aminas secundárias.

A banda observada a 2928 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração de estiramento assimétrico do grupo -CH₂⁶³.

Já as bandas observadas aos 1625 e 1660 cm^{-1} podem ser atribuídos podem ocorrer devido à presença dos grupos carboxilo ($\text{C}=\text{O}$) nas amidas primárias e a banda a 1560 cm^{-1} à presença de amidas secundárias⁶³.

Na figura 21, vê-se o espectro FTIR obtido por Moosa *et al*⁶³, e que apresenta picos semelhantes aos do espectro obtido neste trabalho experimental.

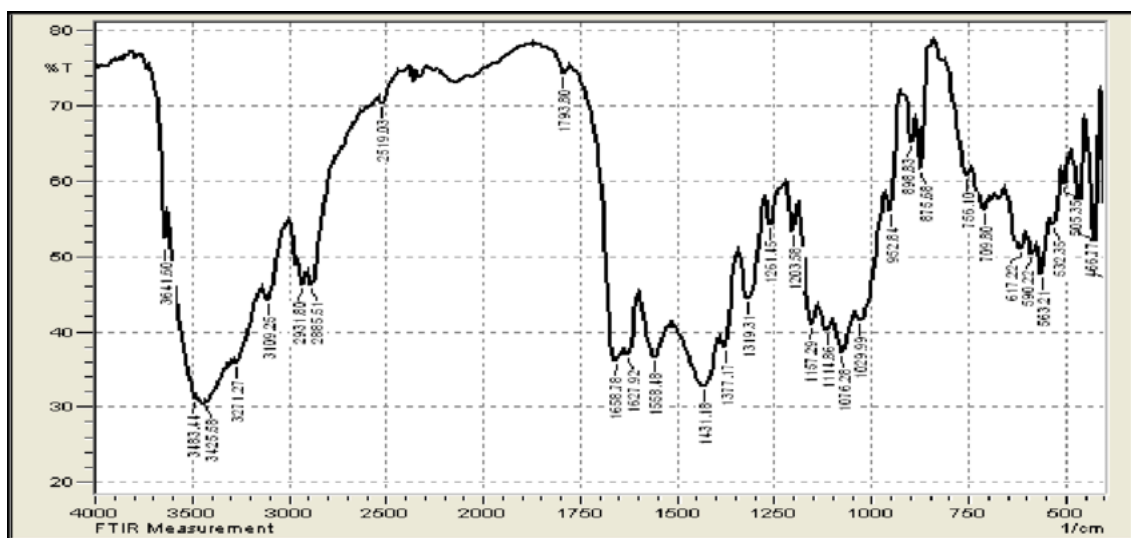


Figura 21 - Espectro FTIR do quitosano obtido a partir das cascas de camarão; obtido por Moosa *et al*.⁶³

4.3 Determinação da concentração de quitosano nas cascas de camarão

4.3.1 Determinação do zero crossing point

Quando se determina a primeira derivada de espectros UV-Vis de ácido acético nas concentrações referidas, é possível reparar que os gráficos obtidos se cruzam exatamente no mesmo ponto – aos 202 nm, tal como demonstrado por Muzzarelli⁶⁴.

Este ponto coincide com o comprimento de onda de absorção máxima da GlcNAc (monómero acetilado do quitosano). Ou seja, é possível determinar a concentração de GlcNAc nas soluções diluídas de quitosano, independentemente da concentração de ácido acético.

Após se determinarem os espectros UV-Vis das soluções de ácido acético nas diferentes concentrações, foi obtida a primeira derivada para cada um dos espectros. Tal como era esperado⁶⁴, os gráficos da primeira derivada cruzam-se nos 203 nm, (*zero crossing point*), como se pode ver na figura 22.

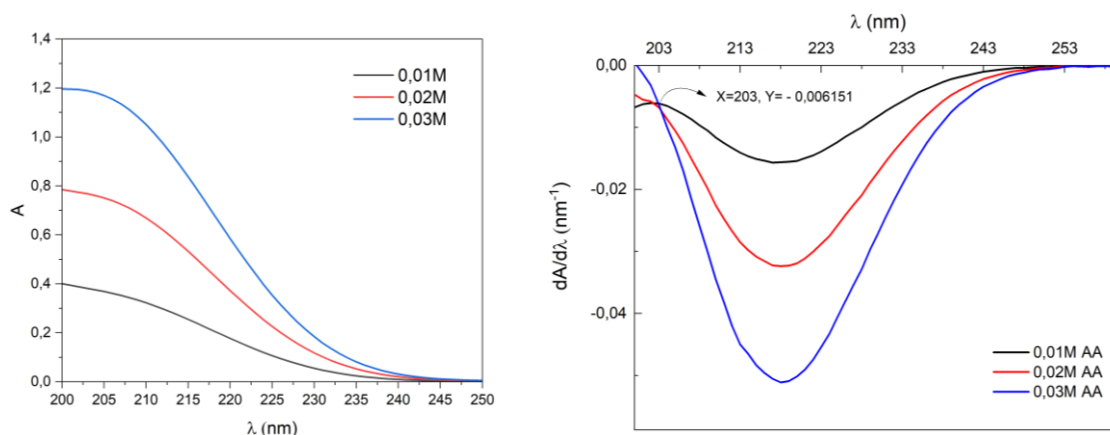


Figura 22 – Espectro UV-Vis das soluções de ácido acético de concentrações 0,01M, 0,02M e 0,03M. À esquerda está o espectro de ordem zero e à direita o espectro da primeira derivada.

O valor da absorvância nos 203 nm é de -0,006, que foi representado como dA/λ_{AcOH} . A partir deste ponto, irá ser possível determinar a concentração de GlcNAc retirando a contribuição da absorvância do ácido acético.

4.3.2 Determinação da curva de calibração de GlcNAc

Foram também obtidos os espectros das soluções de GlcNAc comercial e determinada a primeira derivada destes para traçar uma reta de calibração (figura 23).

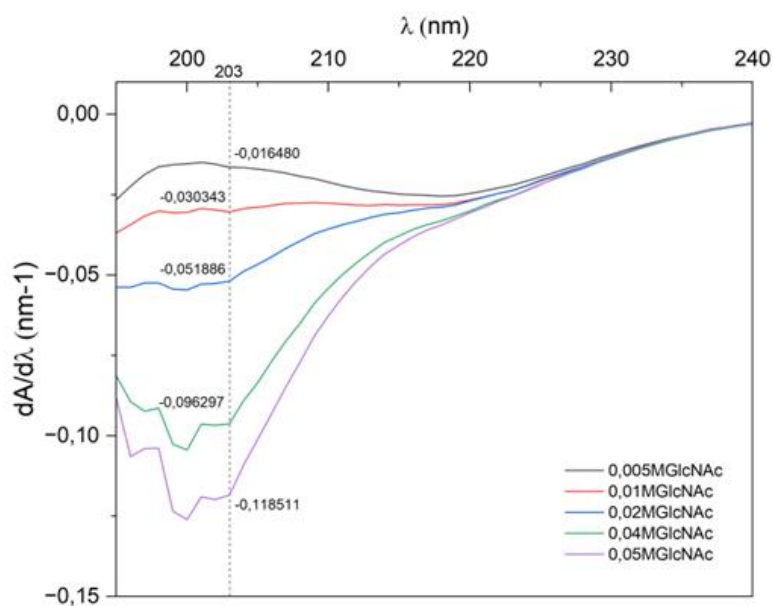


Figura 23 – Espectro UV-Vis da primeira derivada das soluções de GlcNAc de diferentes concentrações em ácido acético 0,01M.

A partir da sobreposição dos espectros da primeira derivada das soluções de GlcNAc numa solução de 0,01M de ácido acético, foi possível determinar os valores de absorvância no comprimento de onda de 203 nm. A estes valores de absorvância retirou-se o valor correspondente à contribuição da primeira derivada da absorvância da solução de ácido acético 0,01M, valor designado por $dA/d\lambda_{\text{GlcNAc}} - dA/d\lambda_{\text{AcOH}}$. Estes valores estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 – Valores de abs da primeira derivada para $\lambda = 203$ nm do espectro de GlcNAc e valores de abs após subtração da contribuição do ácido acético 0,01M.

Concentração de GlcNAc (mg/mL)	$dA/d\lambda_{\text{GlcNAc}} \text{ (nm}^{-1}\text{)}$	$dA/d\lambda_{\text{GlcNAc}} - dA/d\lambda_{\text{AcOH}} \text{ (nm}^{-1}\text{)}$
0,005	-0,016480	-0,01033
0,01	-0,030345	-0,02419
0,02	-0,051886	-0,04574
0,04	-0,096297	-0,09015
0,05	-0,118511	-0,1124

Utilizando os valores de concentração de GlcNAc e os valores de $dA/d\lambda_{\text{GlcNAc}} - dA/d\lambda_{\text{AcOH}}$, foi possível construir o gráfico 1, de onde obteve a equação da reta de calibração.

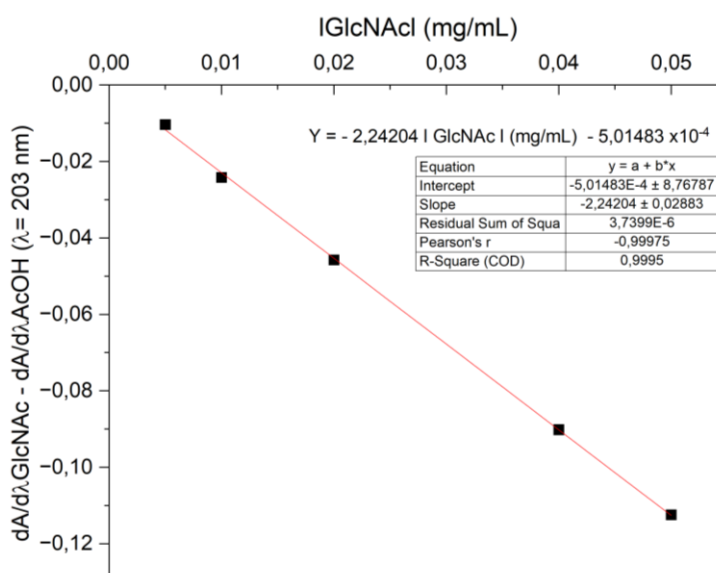


Gráfico 1 – Valores de $dA/d\lambda_{\text{GlcNAc}} - dA/d\lambda_{\text{AcOH}}$ em função das concentrações de GlcNAc.

A partir desta equação obtida é possível calcular as concentrações de quitosano nas cascas de camarão e nos extratos sólidos da ESA, que será feito no subcapítulo 4.3.3.

4.3.3 Determinação da concentração de quitosano nas cascas de camarão e no extrato da ESA

Após a obtenção da curva de calibração, procedeu-se à determinação da concentração de quitosano nas amostras. Começou por se determinar os valores da primeira derivada dos espectros UV-Vis das amostras de quitosano obtidas em laboratório e em quitosano comercial, tal como está expresso no gráfico 2.

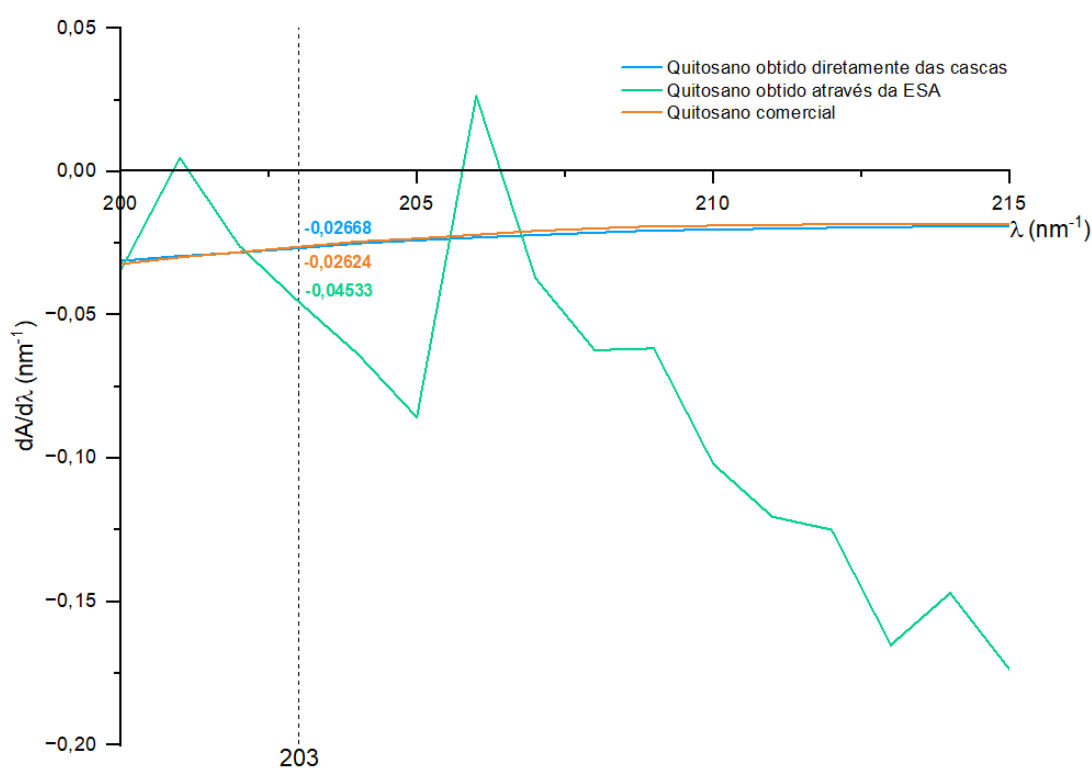


Gráfico 2 – Valores da primeira derivada das amostras de quitosano obtido em laboratório e quitosano comercial.

De seguida, foi calculado a concentração de GlcNAc nas amostras, utilizando a equação da curva de calibração previamente obtida no gráfico 1. Os resultados estão expressos na tabela 3. Depois de obtida a concentração de GlcNAc em mg/mL, calculou-se a concentração deste monómero na solução de ácido acético em que estava contido, como está representado na tabela 3.

Tabela 3 - Valores da 1ª derivada do espectro do UV-Vis das soluções de quitosano preparadas a $\lambda = 203$ nm e valores de concentração de GlcNAc (em mg/mL) nas amostras de quitosano.

Amostra de quitosano	dA/d λ	[GlcNAc] (mg/mL)	[GlcNAc] (mg/mL) na amostra diluída em 10mL de AcOH 0,01M
Quitosano obtido diretamente das cascas de camarão	-0,02668	$1,12 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-1}$
Quitosano obtido através da ESA	-0,04533	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-1}$
Quitosano comercial	-0,02624	$1,15 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-1}$

Contudo, o espectro UV-Vis do quitosano obtido através da ESA (a verde) não é da melhor qualidade, visto que tem vários valores díspares, o que pode significar que os resultados não são precisos.

4.4 Propriedades dos filmes de quitosano

Um bom filme baseado em polímeros é caracterizado pela sua capacidade de isolamento, não permitir a passagem de raios UV⁶⁵, ser biodegradável, não tóxico e resistente⁶⁶.

Os filmes preparados com quitosano comercial dissolveram-se sem dificuldade na solução de ácido acético e foi possível fazer um filme mesmo sem adicionar o glicerol, tal como seria esperado e já está descrito vastamente na literatura^{56,67}, dado que a solução de quitosano e ácido acético era suficientemente viscosa e não precisava de plastificante. Ainda assim, de modo a se poderem comparar os diversos parâmetros, foi preparado um filme com quitosano comercial e glicerol.

De entre vários ácidos, o ácido acético é o que se mostra ser mais eficaz para dissolver o quitosano e formar filmes mais resistentes⁶⁸ e flexíveis⁵⁶, daí ter sido o solvente escolhido neste procedimento experimental.

Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 24.

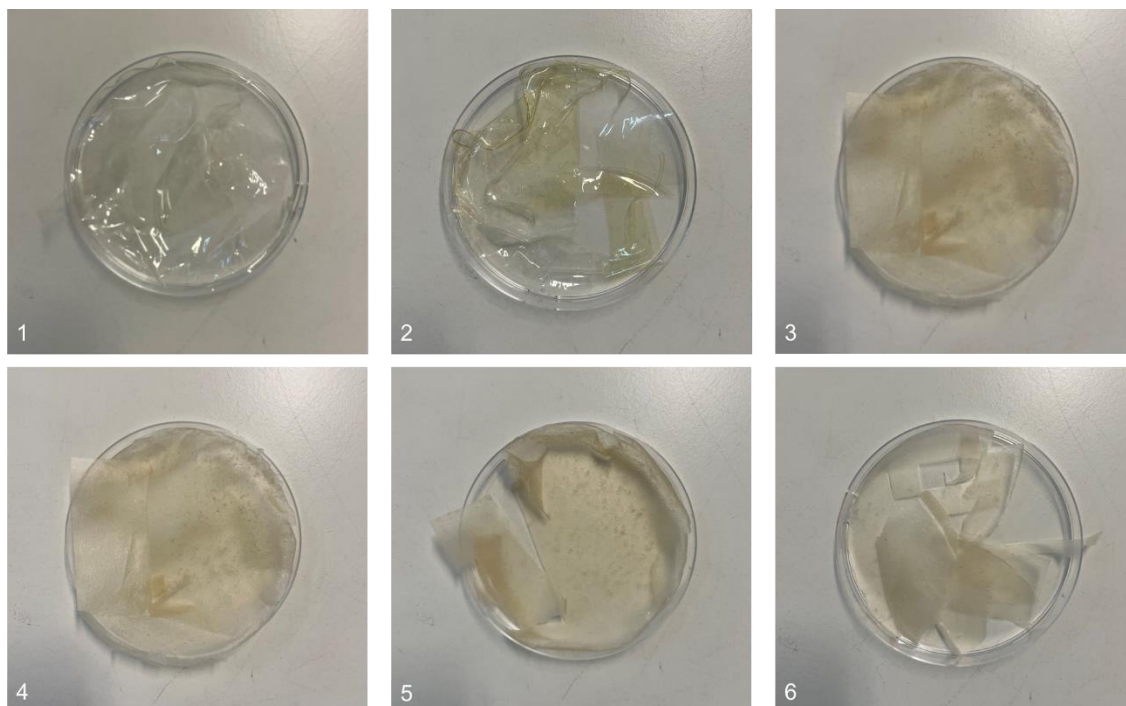


Figura 24 – Filmes de quitosano obtidos nas diferentes condições: filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

É importante ressaltar, também, que os filmes preparados tinham uma grande quantidade de bolhas de ar, principalmente o filme 2, o que poderá influenciar diversos parâmetros, nomeadamente a espessura e a resistência dos filmes.

4.4.1 Resistência à humidade e solubilidade

A solubilidade descreve a capacidade dos filmes preparados se dissolverem em água. O quitosano não é solúvel em água nem em solventes orgânicos, mas o uso deste polímero na preparação de filmes apresenta alguns problemas devido à sua grande permeabilidade⁶⁹, contudo, é possível alterar alguns parâmetros na preparação dos filmes, como alteração do pH e do ácido utilizado para dissolver o quitosano, para melhorar as suas propriedades.

Já a capacidade de retenção da água (WHC) caracteriza-se pela quantidade máxima de água que o filme consegue reter. Neste caso, um baixo valor de WHC é desejável para que os filmes não retenham humidade e, consequentemente, estraguem os alimentos com mais rapidez.

Como se pode ver na figura 25, os valores de WHC variaram entre 0 (filme 5) e 1,738 $\pm$ 0,600 (filme 1).

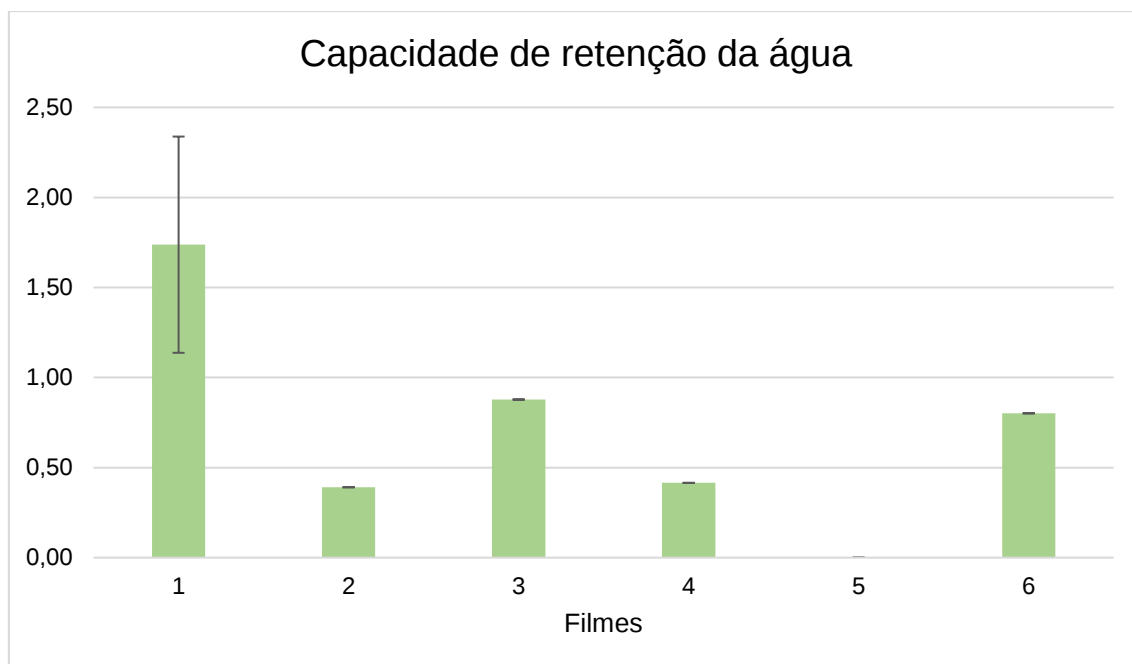


Figura 25 – Capacidade de retenção da água dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

Terminado o ensaio, o filme 1 apresentou uma consistência gelatinosa, sugerindo uma maior absorção de água, o que não é desejável. Os filmes preparados com quitosano extraído das cascas de camarão (filmes 3-6) apresentaram valores de WHC cerca de duas vezes inferiores ao do filme desenvolvido com o quitosano comercial (filme 1).

O filme 4 (ESA, 0,1%, glicerol e preparado com 2% ácido acético) apresentou um valor de WHC de 0,415, cerca de 4 vezes inferior ao valor reportado para o filme à base de quitosano comercial.

Os resultados estão descritos em maior detalhe na tabela A3 (em anexo).

Como se pode ver na figura 24, valores de percentagem de solubilidade variaram entre 22,832% $\pm$ 0,035 (filme 4) e 81,818% $\pm$ 25,713 (filme 2). O filme 1 e o filme 3 apresentaram valor de solubilidade semelhante, que rondou os 48%. Ambos os filmes tinham a mesma concentração de ácido acético (1% v/v) ainda que o filme 3 contivesse 0.3% (m/v) de glicerol.

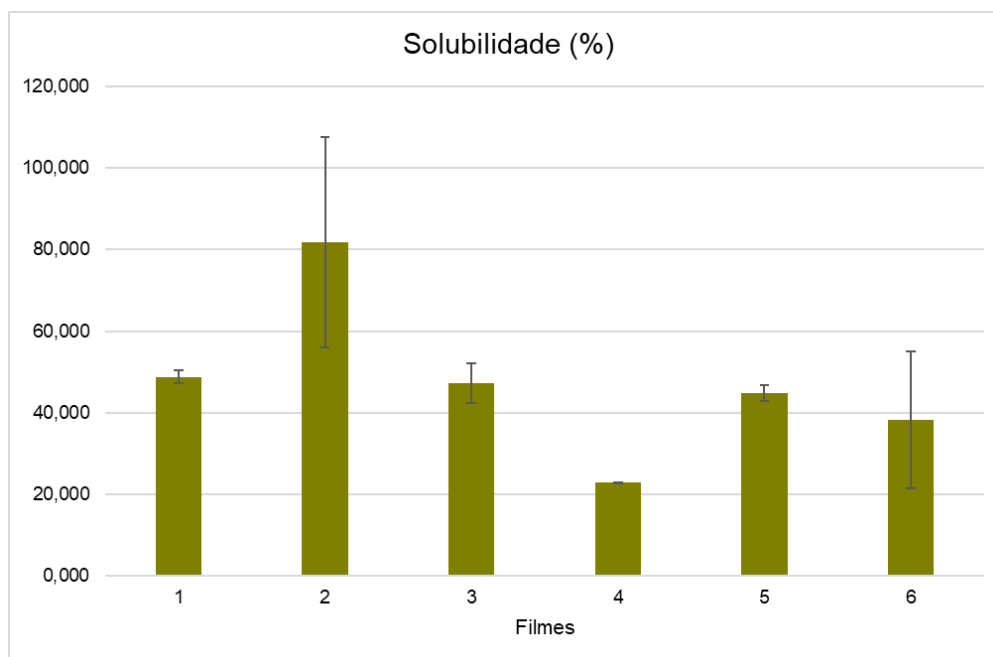


Figura 26 - Percentagem de solubilidade dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

Dado os resultados obtidos, é possível concluir que para os filmes desenvolvidos com o quitosano preparado no âmbito do estudo (quer por extração direta das cascas, filme 3, quer por ESA) uma maior composição de glicerol contribui para uma maior solubilidade do filme.

No entanto, dado o elevado valor de desvio padrão nos diferentes resultados, seria prudente repetir este teste, o que, neste caso, não foi possível dada a quantidade limitada de quitosano disponível.

Como descrito por Elhussieny *et al.*⁷⁰, o ácido acético promove a formação de interações fortes entre as cadeias dos polissacarídeos, tornando os filmes mais resistentes à solubilidade. Assim sendo, seria de esperar que o filme 4 apresentasse menor percentagem de solubilidade, dado que tem maior concentração de solvente e menor quantidade de glicerol, que foi o que aconteceu.

4.4.2 Espessura

A espessura média dos filmes está expressa na tabela A5 (em anexo). Estes valores foram usados para determinar a capacidade da barreira UV e opacidade, assim como as propriedades mecânicas. Como se pode observar na figura 27, o filme 5 (ESA; 0,3

g de glicerol e 2% ácido acético) foi o que obteve maior espessura média ($0,215 \text{ mm} \pm 0,025$), o que se pode dever ao uso de maior quantidade de glicerol utilizada, assim como de solvente mais concentrado. Já o filme com menor espessura média foi o filme 1 ($0,049 \text{ mm} \pm 0,009$), preparado apenas com quitosano comercial e sem plastificante.

Relativamente aos filmes preparados com o quitosano obtido neste trabalho experimental, o que obteve menor espessura foi o filme 6 (ESA; 0,3 g de glicerol e conc. de solvente de 1%), com um valor médio de $0,129 \text{ mm} \pm 0,011$. Este valor poderá ser explicado pelo facto de ao ter menor quantidade de ácido acético, pode ter havido maior dificuldade em dissolver o quitosano, o que resultou num filme não tão espesso.

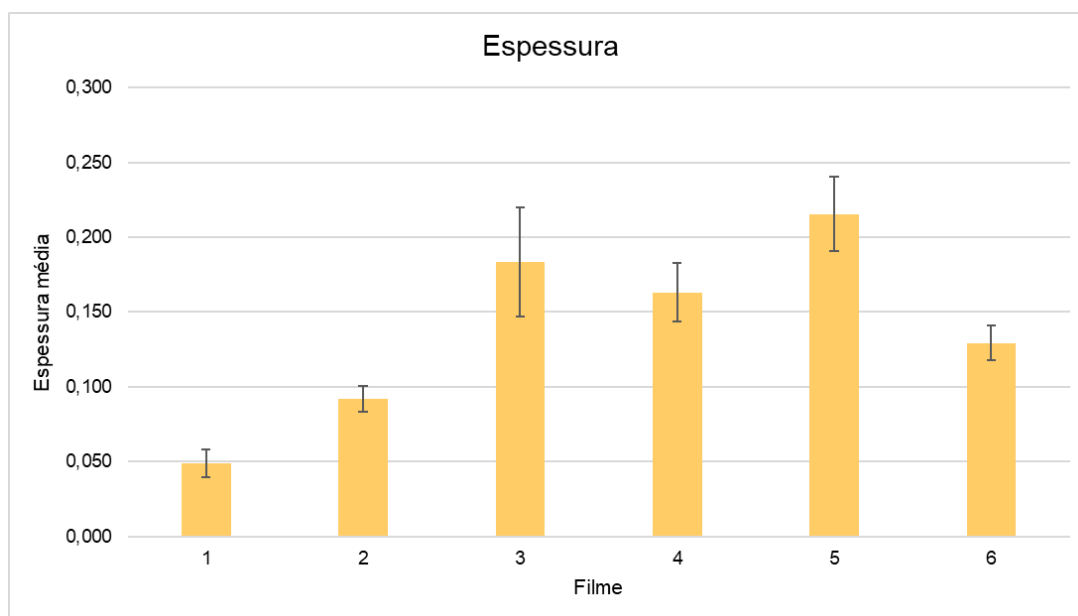


Figura 27 - Espessura média dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

Eulálio *et al.*⁵⁶ obtiveram um filme com 0,078 mm de espessura. Este filme foi preparado com ácido acético e 2g de quitosano para uma concentração de 2% (m/v), ou seja, foi utilizado mais quitosano extraído das cascas que neste trabalho experimental e não foi utilizado plastificante. Em condições semelhantes foi preparado o filme 1, que também não utilizou plastificante e possuía uma menor quantidade de quitosano e, consequentemente, a menor espessura.

Deste modo, pode concluir-se que tanto o plastificante, como o aumento da quantidade de quitosano presente nos filmes irá aumentar a sua espessura. Porém, uma espessura mais reduzida é o desejável num filme desta natureza devido ao aumento da sua transparência⁶⁵.

Mesmo considerando este fator, este parâmetro não pode ser avaliado individualmente, dado que um bom filme se caracteriza por um conjunto de bons parâmetros, tal como já foi referido. Assim, é importante ter os outros fatores estudados em conta.

4.4.3 Propriedades mecânicas

Para as propriedades mecânicas foram determinados diversos parâmetros: a máxima tensão (tensão máxima que um filme pode receber antes de se romper), capacidade elástica (capacidade do filme de se deformar e voltar à forma original depois de lhe ser aplicada tensão), e a percentagem de máxima deformação.

O ácido escolhido para a preparação dos filmes é essencial para se obter boas propriedades mecânicas⁶⁸, e o ácido acético mostrou-se o melhor ácido para a formação dos filmes, tal como já tinha sido referido.

Os valores das propriedades mecânicas encontram-se descritos em maior detalhe na tabela A4 (em anexo).

4.4.3.1 Máxima tensão

Como se pode observar na figura 28, o filme 1 (quitosano comercial sem glicerol) foi o filme que obteve maior valor de tensão à rutura (29,74 Mpa), enquanto o filme 2 apresentou um menor valor (1,91 MPa), como se pode verificar na figura 28. Esta diferença poderá ter sido causada pela adição do glicerol, dado que ambos foram preparados com quitosano comercial.

Melro *et al.*⁶⁸ obtiveram um valor de cerca de 4 MPa. Este valor é mais próximo do que foi obtido no filme 3 (4,40 MPa).

De entre os filmes preparados com o quitosano das cascas de camarão, o filme 4 foi o que apresentou maior máxima tensão (16,53 MPa). Já os filmes 5 e 6 apresentaram valor de máxima tensão relativamente semelhantes.

Estes valores estão relacionados com a quantidade de glicerol adicionada, dado que quanto mais glicerol se adicionou aos filmes, menor foi o valor de máxima tensão.

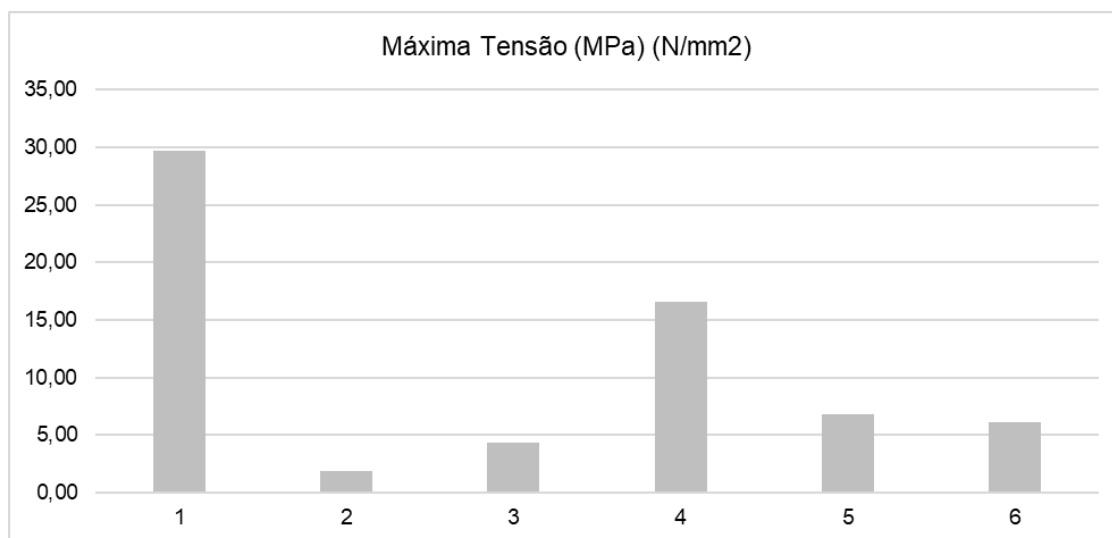


Figura 28 - Máxima tensão dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

Os plastificantes têm como função aumentar a flexibilidade dos polímeros⁷¹. Reduzem a tensão de deformação, densidade e viscosidade destes⁷¹, o que vai de encontro aos resultados obtidos.

4.4.3.2 Capacidade elástica

Os valores de capacidade elástica variaram entre 16, 89 N/mm² e 414,33 N/mm², sendo que o filme 2 obteve o menor valor e o filme 1 um maior valor de capacidade elástica, tal como se verificou na máxima tensão. Este valor poderá ser, novamente, justificado pela adição do glicerol.

O filme 4 (0,1g de glicerol) apresentou uma capacidade elástica muito semelhante à do filme 1 e muito superior à dos outros filmes preparados com quitosano das cascas de camarão.

Contudo, durante a testagem destes parâmetros, os filmes 1, 4 e 6 rasgaram, revelando que não são tão resistentes à deformação quanto os restantes.

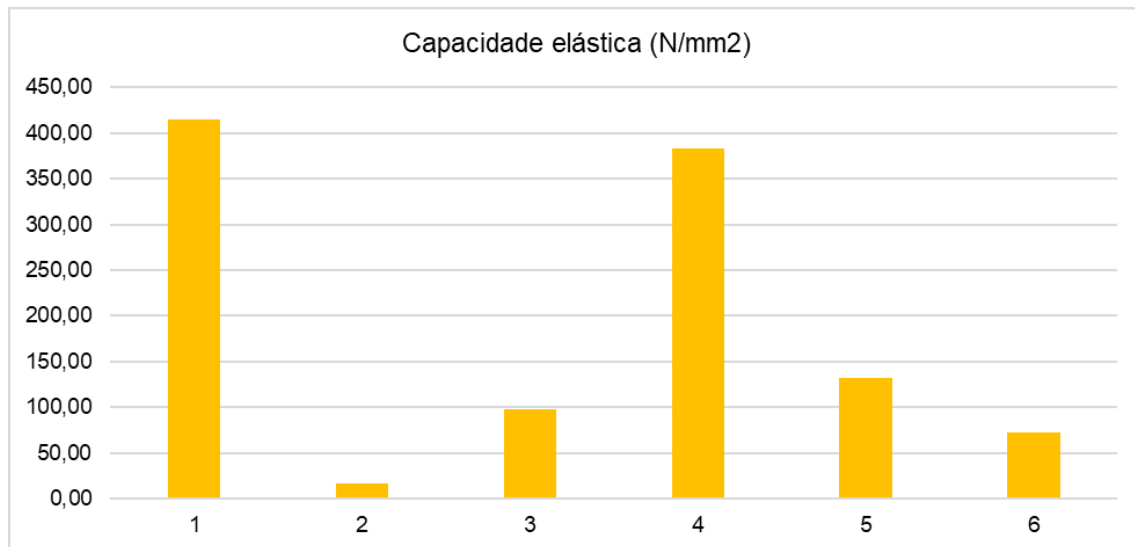


Figura 29 - Capacidade elástica dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

4.4.3.3 Percentagem de máxima deformação

Os valores de máxima deformação variaram entre 4,57% (filme 1) e 11,48% (filme 2). Dado que a única variação entre estes filmes foi a adição de glicerol, conclui-se que o plastificante afeta este parâmetro, como já seria esperado⁷¹. Apesar da grande percentagem de máxima deformação, o filme 2 apresentou-se muito frágil.

Os restantes filmes, que foram preparados com o quitosano das cascas de camarão apresentam valores de máxima tensão relativamente semelhantes.

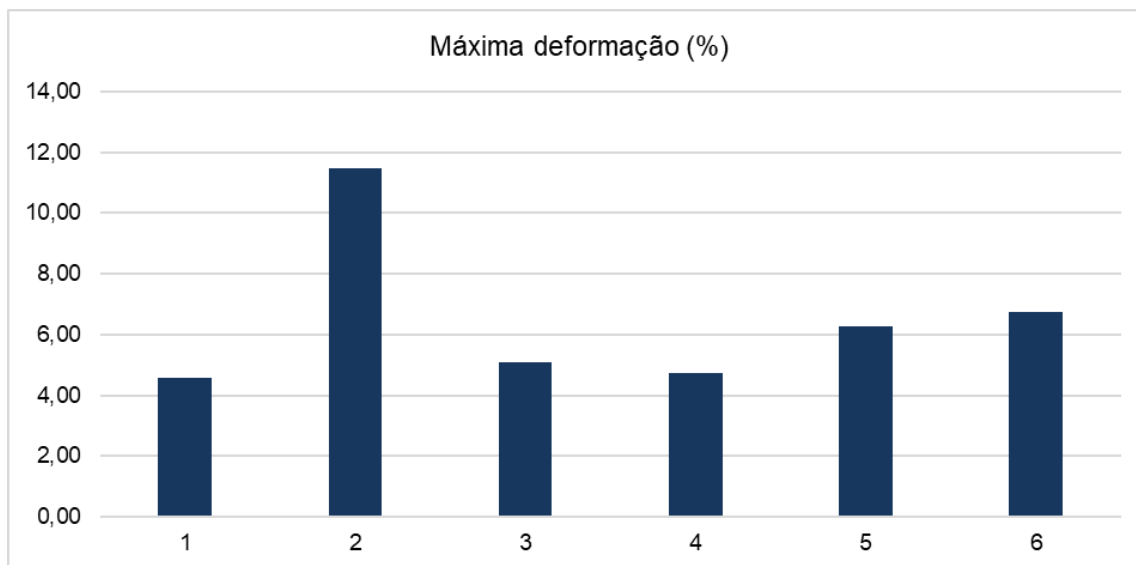


Figura 30 - Percentagem de máxima deformação dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

4.4.4 Opacidade e capacidade da barreira UV

A luz, especialmente a luz UV, tem um papel importante no processo de oxidação e por catalisar os processos de degradação dos alimentos. Logo, é necessário que um filme apresente capacidade de proteger os alimentos da luz e da radiação UV⁷¹.

Os valores de opacidade variaram entre 0,739 (filme 2) e 5,914 (filme 4). Seria esperado que com o aumento da espessura, houvesse um aumento da opacidade, mas tal não se verificou.

A opacidade é um parâmetro influenciado diretamente pelo tipo de ácido e pela percentagem utilizada, ainda que, no caso do ácido acético, a percentagem não tenha grande influência⁶⁸. Este facto pode explicar o porquê de um filme que utiliza menor percentagem de ácido acético apresentar um maior valor de opacidade, ou seja, não faria diferença a sua concentração.

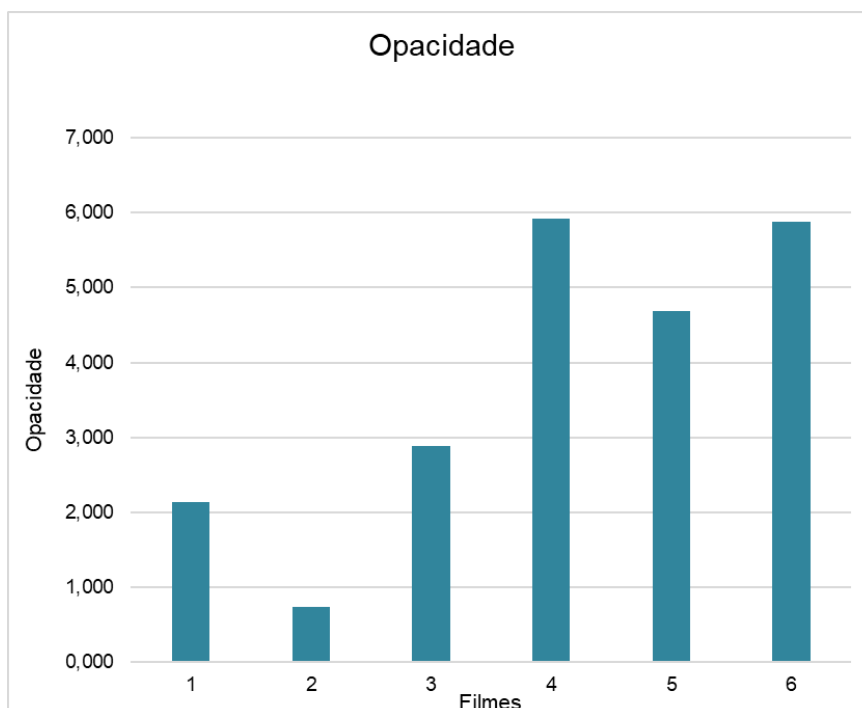


Figura 31 - Opacidade dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

Analisando a figura 31 percebe-se que o filme 2 foi o que obteve menor valor de opacidade, sendo menos de metade que o valor obtido no filme 1, em que não foi adicionado o plastificante.

Dado que quando se utiliza quitosano comercial não há necessidade de adicionar glicerol, pode-se concluir que quando este está em demasia também não é ideal, pois as características do filme podem piorar.

O filme 4 e o filme 6 utilizaram tanto quantidades de quitosano diferentes, como diferentes concentrações de ácido acético, no entanto, obtiveram valores semelhantes de opacidade, ainda que a sua espessura tenha valores relativamente diferentes (0,163 e 0,129, respetivamente).

Já o filme 5, apesar de ser o que apresenta maior espessura, não é o que tem maior valor de opacidade.

Quanto ao filme 3, que utilizou quitosano obtido diretamente das cascas de camarão, apesar de apresentar maior valor de opacidade do que os filmes preparados com

quitosano comercial, não mostrou tão bons resultados comparativamente aos filmes feitos com quitosano obtido pela ESA.

Melro *et al.*⁶⁸ prepararam um filme em condições semelhantes às deste trabalho experimental em que utilizaram uma concentração de ácido acético de 2% e obtiveram um valor de opacidade de 1,6, que é um valor inferior aos apresentados na tabela A8 (em anexo).

Relativamente à capacidade da barreira UV, os resultados estão expressos na figura 32. O filme 4 foi o que obteve maior capacidade de barreira UV (365 AU x nm) e o filme 1 a menor (103,133), um valor cerca de três vezes menor. Os filmes 5 e 6 apresentaram valores muito semelhantes, mostrando que o ácido acético não mostra grande diferença neste parâmetro, dado que ambos contêm a mesma quantidade de glicerol, tal como acontece na opacidade.

Relativamente ao filme 3, verifica-se a mesma situação que na opacidade, apesar de apresentar valores superiores aos do quitosano comercial, não apresenta os mesmos resultados que os filmes preparados com quitosano obtido na ESA.

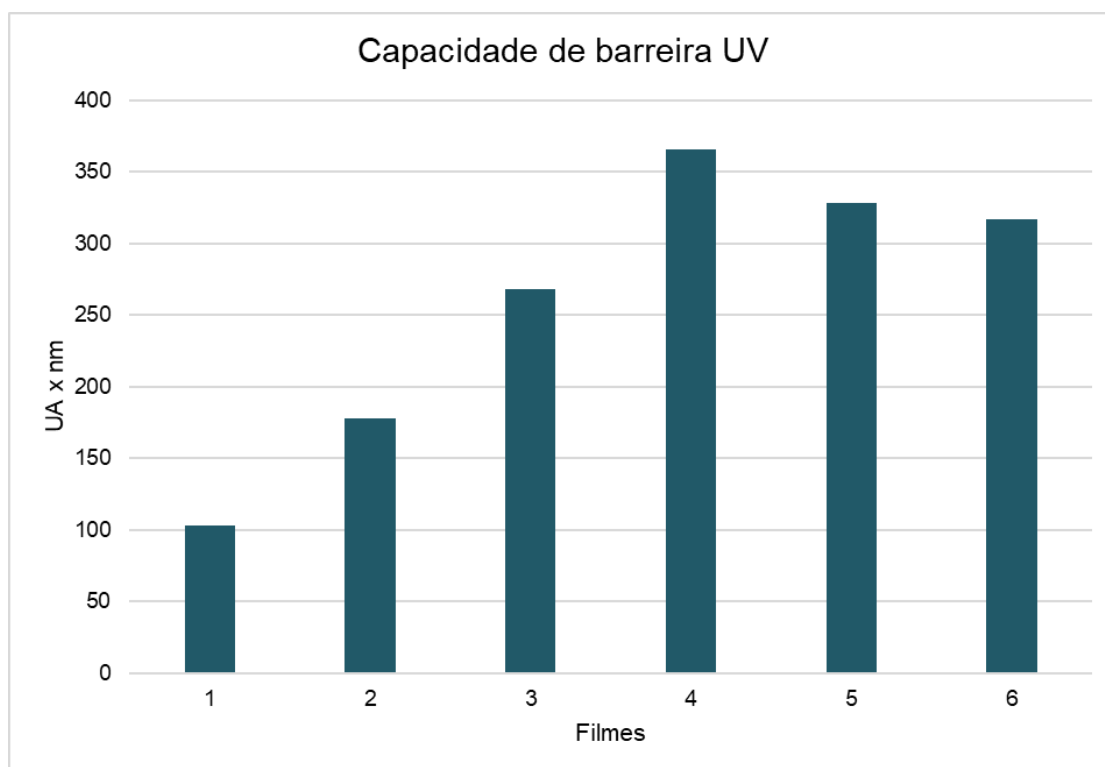


Figura 32 - Capacidade da barreira UV dos filmes de quitosano; filme 1 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0% glicerol); filme 2 (quitosano comercial, 1% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 3 (direto das cascas, 1% ácido acético,

0,3% glicerol), filme 4 (ESA, 2% ácido acético, 0,1% glicerol), filme 5 (ESA, 2% ácido acético, 0,3% glicerol), filme 6 (ESA, 1% ácido acético, 0,3% glicerol).

Portanto, os filmes preparados a partir do quitosano das cascas de camarão, tanto o obtido diretamente das cascas de camarão, como o quitosano obtido a partir da ESA, apresentaram melhor opacidade e melhor capacidade UV relativamente aos filmes preparados com quitosano comercial, mostrando desde já potencial na preparação de um filme eficiente.

Considerando todos os parâmetros, é possível concluir que o filme 4 foi o que obteve melhores características: é o filme mais forte e resistente, menos solúvel e com reduzido valor de WHC, ainda que apresente algumas fraquezas.

O uso do ácido acético, apesar de se apresentar como o mais eficaz na dissolução do quitosano, atribui um cheiro a este aos filmes, que poderá limitar o seu uso em alimentos.

Assim sendo, os filmes de quitosano extraído das cascas de camarão apresentam potencial, mas há necessidade de melhorar as suas características e os aspetos da sua preparação, abrindo portas para a realização de trabalhos futuros.

5. Conclusão e perspetivas de trabalho futuro

Atualmente, as cascas de camarão representam um problema ecológico pois são descartadas nos oceanos ou em aterros. Devido às suas características físico-químicas apresentam grande potencial para a extração de compostos bioativos, como a astaxantina e outros carotenoides, assim como a quitina que pode ser convertida em quitosano, e ter diversas aplicações em diferentes indústrias, como a indústria alimentar e cosmética para formular produtos de valor acrescentado.

Neste trabalho, pretendia-se extrair compostos bioativos de forma eficaz e usando solventes mais “verdes”. Após aplicação de diferentes técnicas de extração, foi possível concluir que a ESA a 200°C é uma alternativa rápida, sustentável e eficaz, permitindo obter valores de TPT e TCT de $5,43 \pm 0,17$ mg EAA/g cc e $59,9 \pm 1,0$ µg carotenoides/g cc, respetivamente, que são cerca de cinco vezes superiores aos valores obtidos na EC. A atividade antioxidante dos extratos obtidos também foi superior quando se aplicou a ESA, sendo mais do dobro comparativamente a outros métodos também conhecidos como verdes, como é o caso da EAU. É também importante ressaltar que a razão massa de casca de camarão/solvente mostrou influência nos resultados obtidos, sendo por isso interessante estudar de que forma este aspeto influencia os resultados das extrações.

No futuro, seria interessante determinar por HPLC qual a composição fenólica e que tipo de carotenoides foram extraídos das cascas de camarão, assim como o teor que foi obtido individualmente de cada composto de forma a potencializar a sua aplicação noutros produtos.

Paralelamente, foi extraído quitosano das cascas de camarão, assim como dos extratos da ESA a 200°C, permitindo obter filmes que poderão ser utilizados para embalar alimentos. Estes filmes são biodegradáveis e, por isso, mostram-se desde já como uma alternativa aos plásticos baseados em petróleo. Os filmes apresentaram algumas características desejáveis, como boa opacidade e capacidade de barreira UV (valores cerca de 3 vezes superiores aos filmes preparados com quitosano comercial), que permite proteger os alimentos de uma rápida degradação. No entanto, apresentam-se mais frágeis que os filmes de quitosano comercial preparados em condições semelhantes.

Assim sendo, apesar do potencial do quitosano extraído das cascas de camarão na aplicação dos filmes, o desenvolvimento destes encontra-se ainda numa fase precoce

e surge a necessidade de melhorar alguns aspetos, nomeadamente o aumento da sua resistência e assim como melhorar o seu odor devido a utilização de ácido acético no procedimento experimental.

Considerando o grande aumento da cultura em viveiros de marisco a nível mundial, o uso das cascas de camarão para recuperação dos compostos bioativos e a sua incorporação em produtos de valor acrescentado pode representar um impacto positivo a nível económico, social e ambiental. Com este trabalho é possível concluir que o potencial das cascas de camarão é inegável e há diversas aplicações possíveis, que podem ajudar na resolução dos problemas ambientais por elas gerados.

6. Referências Bibliográficas

1. Adeyeye, E. I. & Aremu, M. O. CHEMICAL COMPOSITION OF WHOLE SHRIMP, FLESH AND SHELL OF *Pandalus borealis* FROM LAGOS ATLANTIC OCEAN. *FUW Trends Sci. Technol. J. ftstjournal@gmail.com April* **1**, 20485170–20485196 (2016).
2. Samuthirapandian, R., Rameshkumar, G., Ravichandran, S., Rameshkumar, G. & Prince, A. R. Biochemical Composition of Shell and Flesh of the Indian White Shrimp *Penaeus indicus* (H.milne Edwards 1837). *J. Sci. Res.* **4**, 191–194 (2009).
3. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2019/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2019. *FAO Yearb. Fish. Aquac. Stat. 2019/FAO Annu. Stat. des pêches l'aquaculture 2019/FAO Anu. Estadísticas pesca y Acuic. 2019* (2021) doi:10.4060/CB7874T.
4. INE. *Estatísticas da Pesca 2020. Estatísticas da Pesca 2020* (2021).
5. Ferreira Ribeiro, L., Macedo de Souza, M., Barros, F. & Hatje, V. Desafios da carcinicultura: aspectos legais, impactos ambientais e alternativas mitigadoras. *J. Integr. Coast. Zo. Manag.* (2013).
6. Rødde, R. H., Einbu, A. & Vårum, K. M. A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydr. Polym.* **71**, 388–393 (2008).
7. Ibrahim, H. M., M. F. Salama & H. A. El-Banna. Shrimp's waste: Chemical composition, nutritional value and utilization. *Nahrung/Food*, 43(6), 418–423 | 10.1002/(sici)1521-3803(19991201)43:6<418::aid-food418>3.0.co;2-6. (1999).
8. Fernandes Cavalcanti, C. *et al.* Produção de Quitosana a partir da fermentação da casca de camarão. *Rev. Bras. Prod. Agroindustriais* 503–515 (2016).
9. Nunes, A. N. *et al.* Astaxanthin Extraction from Marine Crustacean Waste Streams: An Integrate Approach between Microwaves and Supercritical Fluids. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(8), 3050–3059 | 10.1021/acssuschemeng.0c06534. (2021).
10. Benhabiles, M. S. *et al.* Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocoll.* **29**, 48–56 (2012).
11. Šimat, V., Rathod, N. B., Čagalj, M., Hamed, I. & Mekinić, I. G. Astaxanthin from Crustaceans and Their Byproducts: A Bioactive Metabolite Candidate for Therapeutic Application. *Mar. Drugs* 2022, Vol. 20, Page 206 **20**, 206 (2022).
12. Seymour, T. A., Jing Li, S. & Morrissey, M. T. Characterization of a Natural Antioxidant from Shrimp Shell Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 682–685 | 10.1021/jf950597f. *J. Agric. Food Chem.* (1996).
13. Gao, J. *et al.* Recovery of astaxanthin from shrimp (*Penaeus vannamei*) waste by ultrasonic-assisted extraction using ionic liquid-in-water microemulsions. *Food Chem.* **325**, 126850 (2020).
14. Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M. & Chiang, Y. W. Intensified green production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food Bioprod. Process.* **99**, 1–11 (2016).

15. Abbas, M. *et al.* Natural polyphenols: An overview. *Int. J. Food Prop.* **20**, 1689–1699 (2017).
16. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 287–306 (2005).
17. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270–278 (2009).
18. Phenoxy radical.
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C2122465&Mask=800>.
19. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. (1998).
20. Soto, M. L., Falqué, E. & Domínguez, H. Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics* **2**, 259–276 (2015).
21. Latscha, T. The role of astaxanthin in shrimp pigmentation. *Adv. Trop. Aquac.* **31**, 319–325 (1989).
22. Maia, M. L. *et al.* Bioactive Compounds of Shrimp Shell Waste from *Palaemon serratus* and *Palaemon varians* from Portuguese Coast. *Antioxidants* **12**, 1–12 (2023).
23. Johnson, E. & Russel, R. Beta-Carotene. in *Encyclopedia of Dietary Supplements* 81–87 (2004).
24. Rajalakshmi, A., Krithiga, N. & Jayachitra, A. Antioxidant Activity of the Chitosan Extracted from Shrimp Exoskeleton. *Middle-East J. Sci. Res.* **16**, 1446–1451 (2013).
25. Ambigaipalan, P. & Shahidi, F. Bioactive peptides from shrimp shell processing discards: Antioxidant and biological activities. *J. Funct. Foods* **34**, 7–17 (2017).
26. Zhang, Q. W., Lin, L. G. & Ye, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Med. (United Kingdom)* **13**, 1–26 (2018).
27. Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Einafshar, S. & Ramaswamy, H. S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell. *Ultrason. Sonochem.* **76**, (2021).
28. Zahari, N. A. A. R., Chong, G. H., Abdullah, L. C. & Chua, B. L. Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Process on Thymol Concentration from *Plectranthus Amboinicus* Leaves: Kinetic Modeling and Optimization. *Process. 2020, Vol. 8, Page 322* **8**, 322 (2020).
29. Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S. & Chemat, F. *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. (Royal Society of Chemistry, 2015).
30. Chemat, F., Muhammed, Z.-E.-H. & Khan, K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. (2010) doi:10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
31. Haghighi, A. & Khajenoori, M. *Subcritical Water Extraction. Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling*

- (InTech, 2013). doi:10.5772/54993.
32. Ibañez, E. *et al.* Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 375–382 | 10.1021/jf025878j. *J. Agric. Food Chem.* (2003).
 33. Singleton, V. L. & Rossi, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viniculture* (1965).
 34. Scott, K. J. Detection and Measurement of Carotenoids by UV / VIS Spectrophotometry. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **00**, 1–10 (2001).
 35. Rønsholdt, B. & McLean, E. Determination of total carotenoid content in rainbow trout muscle by multivariate calibration of VIS reflectance spectra. *J. Food Compos. Anal.* **14**, 345–357 (2001).
 36. ABTS radical cation | C18H16N4O6S4- | CID 90658258 - PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ABTS-radical-cation>.
 37. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Elsevier Sci. Inc.* (1999).
 38. Do, M. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +.
 39. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
 40. Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290–4302 (2005).
 41. Shahidi F., Arachchi J.K.V. & Jeon Y.-J. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* vol. 10 37–51 (1999).
 42. E.-H. Song, J. Shang, D. M. R. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. (Elsevier, 2012).
 43. Hirano, S. Chitin Biotechnology Applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**, 237–258 (1996).
 44. Hosney, A., Ullah, S. & Barčauskaitė, K. A Review of the Chemical Extraction of Chitosan from Shrimp Wastes and Prediction of Factors Affecting Chitosan Yield by Using an Artificial Neural Network. *Mar. Drugs* **20**, (2022).
 45. Azevedo, V. V. C., Chaves, S. a, Bezerra, D. C., Fook, M. V. L. & Costa, a C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Rev. Eletrônica Mater. e Process.* **2.3**, 27–34 (2007).
 46. Szatkowski, T. *et al.* Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan composites. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* **51**, 575–585 (2015).
 47. Rocha, B. B., Timm, G., Silveira, J. D., Galarrara, J. C. & Santos, A. J. R. W. Determinação do grau de desacetilação de amostras de quitosana. 5–24 (2014).
 48. Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K. & Wong, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta* **45**, 713–719 (1998).

49. Roy, S. & Rhim, J. Advances and Challenges in Biopolymer-Based Films. *MDPI* **14**–15 (2022).
50. Abdullah *et al.* Biopolymer-based functional films for packaging applications: A review. *Front. Nutr.* **9**, 1–20 (2022).
51. Koomyart, I. *et al.* Astaxanthin stability and color change of krill during subcritical water treatment. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 3065–3072 (2017).
52. Dorosh, O. *et al.* Vine-canes valorisation: Ultrasound-assisted extraction from lab to pilot scale. *Molecules* **25**, (2020).
53. Stengel, D.B.; Walker, J.M.; Connan, S. Natural Products From Marine Algae. Methods and Protocols. in 1–37 (2015).
54. Carvalho, A. P. *et al.* Microwave-assisted extraction in goji berries: Effect on composition and bioactivity, evaluated through conventional and nonconventional methodologies. *Int. J. Food Sci. Technol.* **51**, 1401–1408 (2016).
55. Hao, G. *et al.* Physicochemical characteristics of chitosan from swimming crab (*Portunus trituberculatus*) shells prepared by subcritical water pretreatment. *Sci. Rep.* **11**, 1–9 (2021).
56. Eulálio, H. Y. C. *et al.* Physicochemical properties and cell viability of shrimp chitosan films as affected by film casting solvents. I-potential use as wound dressing. *Materials (Basel)*. **13**, 1–18 (2020).
57. Cheng, Y., Xue, F., Yu, S., Du, S. & Yang, Y. Subcritical water extraction of natural products. *Molecules* **26**, 1–38 (2021).
58. Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S. & Ong, E. S. Pressurized hot water extraction (PHWE). *J. Chromatogr. A* **1217**, 2484–2494 (2010).
59. Md Sarip, M. S., Morad, N. A., Mohd Nawi, M. A. H., Tun Abdul Aziz, M. K. & Syed Jaapar, S. Z. imah. Beta-Carotene Enrichment in Crude Palm Oil Using Subcritical Water Extraction and Its Relationship With the Solubility. *Food Chem. Adv.* **2**, (2023).
60. López, A. M. Q., Dos Santos, F. A. R., Martins, E. S., Silva, A. L. D. S. & Dos Santos, E. C. L. Pink and white shrimps from the Brazilian coast: Pigment identification, antioxidant activity and microbial quality under different freezing-times. *Food Sci. Technol.* **41**, 447–457 (2021).
61. Lira, G. M., Lopez, A. M. Q., Firmino, G. O., Santos, S. D. & Bezerra, R. de S. Total carotenoids and antioxidant activity of fillets and shells (in natura or cooked) of “Vila Franca” shrimp (*Litopenaeus Schmitti*) in different intervals of storage under freezing. *Ciência e Agrotecnologia* **41**, 94–103 (2017).
62. IR Spectrum Table & Chart. <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ir-spectrum-table>.
63. Moosa, A., Ridha, A., Moosa, A. A., Ridha, A. M. & Kadhim, N. A. Use of Biocomposite Adsorbents for the Removal of Methylene Blue Dye from Aqueous Solution Use of Biocomposite Adsorbents for the Removal of Methylene Blue Dye from Aqueous Solution. (2016) doi:10.5923/j.materials.20160605.03.
64. Muzzarelli, R. A. A. & Rocchetti, R. Determination of the degree of acetylation of

- chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* **5**, 461–472 (1985).
65. Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S. & Rosa, M. D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 634–643 (2008).
66. Munteanu, S. B. & Vasile, C. Vegetable Additives in Food Packaging Polymeric Materials. *MDPI* (2019) doi:10.3390/polym12010028.
67. Rhim, J.-W., Hong, S.-I., Park, H.-M. & NG, P. K. W. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. 21–23 (2006).
68. Melro, E. *et al.* Chitosan films in food applications. Tuning film properties by changing acidic dissolution conditions. *Polymers (Basel)*. **23**, 1–12 (2021).
69. Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S. K., Weller, C. L. & Hanna, M. A. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *J. Food Sci.* **71**, (2006).
70. Elhussieny, A., Faisal, M., D'Angelo, G., Everitt, N. M. & Fahim, I. S. Experimental investigation of chitosan film reinforced by chitin fibers and chitin whiskers extracted from shrimp shell waste. *J. Eng. Sci. Technol.* **15**, 2730–2745 (2020).
71. Yuan, G. *et al.* Preparation and characterization of shrimp shell waste protein-based films modified with oolong tea, corn silk and black soybean seed coat extracts. *Polym. Test.* **81**, 106235 (2020).

Anexos

Tabela A1 - Designação da amostra e condições de extração em que foram preparadas.

Designação da amostra	Método de extração	Massa de casca de camarão (g)	Solvente	Volume de solvente (mL)	Tempo de extração (min)	Temperatura de extração (°C)
1	Extração convencional	1,5	Água	30	20	40
2	Extração convencional	1,5	Etanol	30	20	40
3	Extração convencional	1,5	50% Etanol	30	20	40
4	Extração subcrítica com água	7,5	Água	150	20	100
5	Extração subcrítica com água	7,5	Água	150	20	150
6	Extração subcrítica com água	7,5	Água	150	20	200
7	Extração subcrítica com água	7,5	50% Etanol	150	20	100
8	Extração subcrítica com água	7,5	50% Etanol	150	20	150
9	Extração subcrítica com água	7,5	50% Etanol	150	20	200
10	Extração assistida por ultrassons	0,75	Metanol	15	15	TA
11	Extração assistida por ultrassons	3	Ácido cítrico	60	15	TA
12	Extração assistida por ultrassons	3	50% etanol	60	15	TA
13	Extração assistida por ultrassons	3	Água	60	15	TA
14	Extração assistida por ultrassons	3	50% etanol	35	15	TA

Tabela A2 - Teor de polifenóis totais (TPT), teor de carotenoides totais (TCT) e atividade antioxidante, determinada pelos métodos ABTS e FRAP, para os diferentes extratos obtidos para as condições de extração testadas e descritas em detalhe na Tabela A3 (anexo); os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=3$).

Designação da amostra	TPT		TCT		ABTS		FRAP	
	mg GAE/g casca de camarão	Desvio padrão	μg carotenoides/g casca de camarão	Desvio padrão	mg EAA/g casca de camarão	Desvio padrão	mg EAA/g casca de camarão	Desvio padrão
1	1,179	0,273	9,04	0,17	1,507	0,018	0,329	0,033
2	4,159	0,374	0,82	0,04	0,177	0,007	NDa	ND ^a
3	1,369	0,201	8,8	0,5	0,507	0,047	0,238	0,029
4	1,587	0,007	12,559	0,335	6,021	0,463	0,14	0,013
5	3,844	0,215	23,331	0,242	7,283	0,131	0,738	0,027
6	5,359	0,069	59,865	1,039	7,849	0,02	0,785	0,062
7	1,486	0,016	11,669	0,48	4,099	0,158	0,074	0,005
8	4,116	0,157	29,418	1,015	7,407	0,099	1,736	0,044
9	5,43	0,166	56,316	1,481	7,929	0,013	4,35	0,312
10	2,238	0,145	46,4	1,584	1,121	0,014	ND	ND ^a
11	0,511	0,024	11,44	0,339	0,738	0,046	0,2	0,035
12	0,926	0,034	6,88	0,679	3,064	0,065	1,607	0,075
13	1,273	0,043	8,64	0,226	4,31	0,035	1,422	0,159
14	1,152	0,029	7,653	0,528	3,016	0,108	3,512	0,255

ND^a: Não detetado.

Tabela A3 - Percentagem de solubilidade e WHC dos filmes de quitosano; os resultados correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=2$).

Filme	Solubilidade (%)		WHC	
1	48,810	1,684	1,738	0,600
2	81,818	25,713	0,391	0
3	47,248	4,947	0,878	0
4	22,832	0,035	0,415	0
5	44,816	1,892	0	0
6	38,158	16,747	0,801	0

Tabela A4 - Propriedades mecânicas dos filmes de quitosano.

Filme	Espesura (mm)	Máxima Tensão (kPa)	Máxima Tensão (MPa) (N/mm ²)	Capacidade elástica (N/mm ²)	Máxima deformação (%)	Força (N)
1	0,0490	29738,20	29,74	414,33	4,57	43,72
2	0,0880	1913,79	1,91	16,89	11,48	5,05
3	0,2060	4396,10	4,40	97,28	5,08	27,17
4	0,1630	16531,00	16,53	383,55	4,73	80,84
5	0,2150	6818,48	6,82	132,19	6,28	43,98
6	0,1290	6075,53	6,08	72,80	6,75	23,51

Tabela A5 - Propriedades óticas dos filmes de quitosano (capacidade da barreira UV e opacidade).

Filmes	Capacidade da barreira UV		Abs (600 nm)	Espessura (nm)	Opacidade
	Soma das abs da área abaixo da curva 200-400 nm	Soma das abs da área abaixo da curva 400-700 nm			
1	103,133	36,2015	0,105	0,049	0,0051
2	177,555	26,339	0,065	0,088	0,0057
3	267,8535	184,713	0,593	0,206	0,1222
4	365,851	300,295	0,964	0,163	0,1571
5	328,633	311,842	1,008	0,215	0,2167
6	316,8405	235,4955	0,758	0,129	0,0978