

Sara Albino Antunes Valcareggi

**RECUPERAÇÃO E NANOENCAPSULAMENTO DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DE  
PROCESSAMENTO DE SIRI-AZUL (*Callinectes sapidus*)**

Tese de Doutorado submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de  
Doutor em Engenharia de Alimentos

Área de concentração:  
Desenvolvimento de Processos na  
Indústria de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Haiko Hense  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra R.  
S. Ferreira

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Valcareggi, Sara Albino Antunes

Recuperação e Nanoencapsulamento de Compostos Bioativos do Resíduo de Processamento de Siri-Azul (*Callinectes sapidus*) ; Sara Albino Antunes Valcareggi ; orientador, Haiko Hense ; coorientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira. – Florianópolis, SC, 2017.

201 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. *Callinectes sapidus*. 3. Astaxantina. 4. Quitosana. 5. Hidrolisado proteico. I. Hense, Haiko. II. Ferreira, Sandra Regina Salvador, III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

O porto é o lugar mais seguro para um barco, mas ele não foi feito para ficar lá; seu destino é navegar.

(Paulo Coelho)

A decisão mais difícil é a de agir, o resto é meramente obstinação. Você pode fazer qualquer coisa que decidir fazer. Você pode realizar mudanças e assumir o controle de sua vida. Esse é o processo e ele a sua própria recompensa.

(Amelia Earhart)



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde e por me fazer entender todos os dias que o essencial é invisível aos olhos.

Aos meus pais, Benoni e Sônia, pelo exemplo, compreensão e carinho. À minha irmã Bruna, pelo companheirismo. Aos meus avós, Vanderlei e Leia, Joãozinho e Emma (*in memoriam*), pelas orações, carinho, doces e mimos. A todos os familiares que contribuíram para essa conquista.

Ao Giovanni, meu esposo, pela compreensão, amor, parceria e por compartilhar minhas angústias e meus sonhos.

A todos os amigos e colegas que nos fazem entender que a felicidade só é real quando compartilhada. Em especial aos BFFs, pela amizade, momentos vividos e por fazer dessa caminhada algo leve e feliz. Poucos doutorandos têm essa sorte!

A todos os “Mestres” que passaram pela minha vida, pelo compartilhamento de conhecimentos e ensinamentos. E às instituições que intermediaram esses contatos. Em especial à UFSC, onde vivi grande parte da minha vida acadêmica.

Ao Prof. Haiko e a Prof.<sup>a</sup> Sandra, pela amizade, incentivo, e as contribuições sem as quais esse trabalho não seria possível.

Ao Prof. Francisco Goycoolea e a todos os Goycoolers pelos conhecimentos compartilhados, pela acolhedora recepção em Münster (Alemanha) e por me fazer sentir em casa, mesmo estando tão distante.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

O processamento de crustáceos produz uma grande porção de resíduos que, em geral, é subvalorizado ou descartado indevidamente, causando problemas socioambientais. Este resíduo possui alguns compostos químicos com propriedades técnicas e atividades biológicas. O siri-azul (*Callinectes sapidus*) é um crustáceo que pode ser encontrado em grande parte do litoral brasileiro, mas o seu processamento e o descarte do seu resíduo são pouco documentados, já que a sua captura é realizada predominantemente por pesca extrativa artesanal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o aproveitamento do resíduo de processamento de siri-azul na obtenção de compostos bioativos, avaliando diferentes técnicas de extração, caracterização e encapsulamento destes materiais. Inicialmente, a partir do resíduo de siri-azul, foram obtidos hidrolisados proteicos por hidrólise enzimática, uma tecnologia alternativa à tradicional hidrólise proteica química, técnica que causa a degradação dos aminoácidos. A utilização de enzimas no processo de hidrólise mostrou-se eficiente na obtenção de hidrolisados proteicos e extrato rico em carotenoides e não alterou significativamente a estrutura da quitina formada comparada à técnica convencional. A recuperação de astaxantina, principal carotenoide encontrado no resíduo de siri-azul, foi avaliada por diferentes técnicas. Técnicas convencionais foram aplicadas na recuperação a baixa pressão, utilizando solventes orgânicos, e extração supercrítica (ESC) nas condições de 313,15 K e 333,15 K de temperatura e pressões de 10, 20 e 30 MPa, empregando CO<sub>2</sub> puro como solvente. Como modificadores do CO<sub>2</sub> foram utilizados etanol (2%, 4% e 6%, m/m), acetona (4%, m/m) e acetona:etanol (50:50) a 4% (m/m). Os extratos ricos em astaxantina obtidos foram avaliados quanto ao rendimento global de extração, concentração de astaxantina e atividade antioxidante. As extrações a baixa pressão com o uso do solvente etanol apresentaram os melhores rendimentos, mas a atividade antioxidante foi maior em extratos obtidos com a acetona. Apesar dos extratos obtidos com ESC apresentarem baixos rendimentos, a utilização de acetona a 4% como modificador de CO<sub>2</sub> resultou em extratos com alta atividade antioxidante, indicando que esta técnica é viável na obtenção de extratos concentrados com potencial biológico. A recuperação dos carotenoides por diferentes técnicas também não causou alterações significativas na estrutura da quitina recuperada após o processo de despigmentação (recuperação de astaxantina). Por fim, foi realizado o nanoencapsulamento de extrato rico em astaxantina em matriz polimérica de quitosana, ambos

recuperados do resíduo de siri-azul. As nanocápsulas formadas apresentaram tamanho médio entre 209 e 284 nm e obteve-se uma eficiência de encapsulamento de aproximadamente 99%. Foram realizados ensaios de citotoxicidade em células saudáveis (MDCK) do extrato obtido com a técnica de Soxhlet com acetona:etanol (50:50) e das nanocápsulas. O extrato do resíduo de siri-azul apresentou toxicidade às células a partir da concentração de 0,20 mg/mL, entretanto não houve diminuição na viabilidade celular na presença das nanocápsulas nas concentrações avaliadas.

**Palavras-chave:** *Callinectes sapidus*. Astaxantina. Quitosana. Hidrolisado proteico. Atividade antioxidante. Extração com fluido supercrítico. Nanoencapsulamento. Citotoxicidade.



## ABSTRACT

Crustaceans processing generates waste which is generally undervalued or discarded unduly, causing socio-environmental problems. This residue has some chemical compounds with technical properties and biological activities. Blue crab (*Callinectes sapidus*) is a crustacean found in most of the Brazilian coast, but its processing and disposal of its residue are scarcely documented, since its capture is carried out predominantly by artisanal extractive fishing. Therefore, the objective of this study is to evaluate the use of blue-crab processing waste to obtain bioactive compounds, evaluating different techniques for extracting, characterizing and encapsulating these materials. Initially, were obtained protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis, from blue crab waste, an alternative technology to traditional chemical protein hydrolysis, which causes amino acids degradation. Use of enzymes in the hydrolysis process was efficient in obtaining protein hydrolysates and astaxanthin-rich extract and did not change significantly the obtained chitin structure compared to the conventional technique. Astaxanthin recovery from blue crab waste was evaluated by different techniques. Conventional low pressure recovery techniques using organic solvents and supercritical extraction (ESC) under conditions of 313.15 K and 333.15 K temperature and pressures of 10, 20 and 30 MPa using CO<sub>2</sub> as solvent. Ethanol (2%, 4% and 6%, w/w), acetone (4%, w/w) and acetone:ethanol (50:50) at 4% (w/w) were used as CO<sub>2</sub> modifiers. Astaxanthin-rich extract obtained were evaluated through the overall extraction yield, astaxanthin amount and antioxidant activity. Conventional extractions using ethanol as solvent presented the best yields, but the antioxidant activity was higher in extracts obtained with acetone. Although the extracts obtained with ESC showed low yields, use of 4% acetone as CO<sub>2</sub> modifier resulted in extracts with high antioxidant activity, indicating that the technique is feasible in obtaining concentrated extracts with biological potential. Astaxanthin recovery by different techniques did not significantly influence in the chitin structure recovered after the depigmentation process. Finally, astaxanthin-rich extract nanoencapsulation was carried out in a chitosan polymer matrix, both recovered from blue crab waste. Nanocapsules obtained had an average size between 209 and 284 nm and an encapsulation efficiency of approximately 99%. Cytotoxicity assays were performed in healthy cells (MDCK) with extract obtained by Soxhlet method with acetone:ethanol (50:50 v/v) and the nanocapsules. Blue crab waste extract presented toxicity to the cells in concentration of 0.20 mg/mL,

however there was no decrease in cell viability in the presence of nanocapsules at the concentrations evaluated.

**Keywords:** *Callinectes sapidus* Astaxanthin. Chitosan. Protein hydrolysate. Antioxidant activity. Supercritical fluid extraction. Nanoencapsulation. Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Fluxograma geral dos trabalhos produzidos nesta tese divididos em capítulos.....	33
Figura 2.1- Siri-azul gênero <i>Callinectes</i> . ....	36
Figura 2.2 - Estruturas químicas da quitina (1), quitosana (2) e celulose (3).....	39
Figura 2.3 - Extração de quitina e sua N-desacetilação, para a obtenção de quitosana.....	41
Figura 2.4 - Micrografia (100x) de microcápsulas de astaxantina em matriz de quitosana.....	43
Figura 2.5 – Estrutura química da astaxantina. ....	45
Figura 2.6 – Principais morfologias de encapsulados: microcápsula (esquerda); microesfera (direita).....	54
Figura 2.7 - Ilustração de compostos bioativos encapsulados, produzidos por diferentes técnicas de encapsulamento. ....	55
Figura 2.8 – Representação esquemática do mecanismo de emulsificação espontânea. ....	57
Figura 3.1 – Resíduo de siri-azul ( <i>Callinectes sapidus</i> ): (a) preparado na bandeja antes do processo de secagem e; (b) após o processo de secagem.....	63
Figura 3.2 - Fluxograma do processo de hidrólise enzimática do resíduo de siri-azul ( <i>Callinectes sapidus</i> ) na obtenção de quitina, proteína e astaxantina.....	68
Figura 3.3 - Diagrama da unidade de extração com fluido supercrítico.....	72
Figure 4.1 - Flowchart of the enzymatic hydrolysis process for blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) processing waste to obtain chitin, protein, and astaxanthin.....	91
Figure 4.2 - Degree of protein hydrolysis for blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste, using alcalase 3% (■); alcalase 1% (◆); bromelain 3% (●); bromelain 1% (▲).....	96
Figure 4.3 - FTIR spectra of chitin obtained from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ) through enzymatic and alkaline deproteinization.....	101
Figure 4.4 - TG curves for chitin obtained from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ) through enzymatic and alkaline deproteinization.....	103
Figure 4.5 - Scanning electronic microscopy of chitin obtained from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ). ....	105

Figure 5.1 – Overall extraction curve of blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste extract obtained by SFE with pure CO <sub>2</sub> , at 10 MPa, 313.15 K, and flow rates of (■) 8.3 gCO <sub>2</sub> /min e (●) 13.3 gCO <sub>2</sub> /min. ....	119
Figure 5.2 – Global yield (X <sub>0</sub> ) from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste extracts obtained through supercritical CO <sub>2</sub> using ethanol (EtOH), acetone (Ac) and acetone:etanol (Ac:EtOH - 50:50 v/v) as co-solvent. Same letter in same column indicates no statistical difference (p < 0.05). ....	124
Figure 5.3 - Astaxanthin yield from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste extracts obtained by different methods. ....	129
Figure 5.4 - FTIR spectra of chitosan obtained from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ) depigmented by different methods. ....	132
Figure 5.5 - FTIR spectra bands at 1655 cm <sup>-1</sup> and 1590 cm <sup>-1</sup> from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ) chitosan, depigmented by different methods. ....	133
Figure 5.6 – Chitosan TG curves obtained from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ), depigmented by supercritical CO <sub>2</sub> , Soxhlet, and maceration compared to commercial chitosan. ....	135
Figure 5.7 – X-ray patterns for chitosan from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ) depigmented by different methods. ....	136
Figure 5.8 – Scanning electronic microscopy of chitosan obtained from blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ) depigmented by different methods. ....	138
Figure 6.1 - (a) Size and polydispersity index (PDI) and (b) zeta potential of the nanocapsulates of the astaxanthin-rich extract from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) at different concentrations 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL in blue crab (BC-NC) and commercial (C-NC) chitosan polymeric matrix, nanoemulsions (NE) and unloaded (UN) nanocapsules. ....	158
Figure 6.2 - UV-Vis spectra (200–600 nm) of the astaxanthin-rich extract from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste (BC-AST) at different concentrations 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL and the hexane supernatant of the nanoencapsulates with different concentrations of astaxanthin extract in blue crab (BC-NCH and BC-NCL) and commercial (C-NCH) chitosan polymeric matrix. ....	160
Figure 6.3 - Cell viability (%) of MDCK cells treated with the astaxanthin-rich extract from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) in different concentrations (mg/mL). ....	161
Figure 6.4 - Cell viability (%) of the MDCK cells treated with nanoencapsulates with different concentrations of astaxanthin-rich extract from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) in blue crab (black columns) and commercial (grey columns) chitosan polymeric matrix. ....	163

Figura A.I - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em n-hexano, com absorvância no comprimento de onda de 472 nm, para o cálculo de quantidade de astaxantina nos extratos de resíduo de siri-azul ( <i>Callinectes sapidus</i> ).....	193
Figura A.II - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em acetona, com absorvância no comprimento de onda de 475 nm, para o cálculo de quantidade de astaxantina nos extratos de resíduo de siri-azul ( <i>Callinectes sapidus</i> ).....	195
Figura A.III - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em etanol, com absorvância no comprimento de onda de 480 nm, para o cálculo de quantidade de astaxantina nos extratos de resíduo de siri-azul ( <i>Callinectes sapidus</i> ).....	197
Figura A.IV - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em Acetona:Etanol (50:50, v/v), com absorvância no comprimento de onda de 477 nm, realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia e Biotecnologia de Plantas da Universidade de Münster (Alemanha), para o cálculo de quantidade de astaxantina no extrato de resíduo de siri-azul ( <i>Callinectes sapidus</i> ). .....	199
Figura A.V - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em n-hexano, com absorvância no comprimento de onda de 472 nm, realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia e Biotecnologia de Plantas da Universidade de Münster (Alemanha), para o cálculo de eficiência de encapsulamento do extrato de resíduo de siri-azul ( <i>Callinectes sapidus</i> ).....	201



## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição centesimal de hidrolisados obtidos de diferentes crustáceos. ....	52
Tabela 3.1 - Condições de preparo das nanoformulações dos extratos enriquecidos com astaxantina do resíduo de processamento de siri-azul (BC-AST) em matriz polimérica de quitosana do resíduo de siri-azul (BC) e quitosana comercial (C).....	82
Table 4.1 - Characterization of blue crab processing waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ).95	
Table 4.2 - Proximate composition of the protein hydrolysates in soluble fraction for blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste.....	98
Table 4.3 - Extraction yield, amount of astaxanthin, and antioxidant activity from extracts of blue crab waste ( <i>Callinectes sapidus</i> ), obtained from alkaline and enzyme deproteinization. ....	99
Table 5.1 – Global extraction yield ( $X_0$ ) of blue crab waste extracts ( <i>Callinectes sapidus</i> ) through low pressure extractions (LPE) and supercritical fluid extraction (SFE).....	121
Table 5.2 – Astaxanthin yield from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste extracts obtained by low and high pressure methods and their antioxidant activity (%AA) and effective concentration at 50% ( $EC_{50}$ ). ....	126
Table 5.3 - Deacetylation Degree (DD%) of the chitosan samples.....	130
Table 6.1 - Preparation conditions of astaxanthin-rich extract from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste nanoformulations in blue crab and commercial chitosan matrix. ....	148
Table 6.2 - Fatty acids profile of the astaxanthin and fatty acids rich extract from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste. ....	153
Table 6.3 - Physicochemical properties of nanoencapsulates and nanoemulsions with or without astaxanthin-rich extract from blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> ) waste in blue crab and commercial chitosan polymeric matrix. ....	156





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	atividade antioxidante/ <i>antioxidant activity</i>
Abs	absorbância/ <i>absorbance</i>
Ac	acetona/ <i>acetone</i>
Ac:EtOH	acetona:etanol/ <i>acetone:ethanol</i>
Ag	água
ANOVA	análise de variância One-way/ <i>One-way analysis of variance</i>
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
AST	astaxantina/ <i>astaxanthin</i>
BC-AST	extrato do resíduo de siri-azul obtido por Soxhlet com Ac:EtOH (50:50 v/v) utilizado nas nanoformulações/ <i>blue crab waste extract obtained by Soxhlet with Ac:EtOH (50:50 v/v) used in nanoformulations</i>
BHT	butil hidroxitolueno/ <i>butylated hydroxytoluene</i>
CAGR	<i>compound annual growth rate</i>
CG	<i>cromatografia gasosa/gas chromatography</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CM-AE	quitina recuperada do resíduo de siri-azul após a extração da astaxantina utilizando o método de maceração e etanol:acetona, 50:50 v/v, como solvente/ <i>blue crab waste recovered chitin after astaxanthin extraction using maceration method and ethanol:acetone, 50:50 v/v, as solvent</i>
CM-E	quitina recuperada do resíduo de siri-azul após a extração da astaxantina utilizando o método de maceração e etanol como solvente/ <i>blue crab waste recovered chitin after astaxanthin extraction using maceration method and ethanol as solvent</i>
CO <sub>2</sub>	dioxido de carbono/ <i>carbon dioxide</i>
CRS	quitina do resíduo de siri-azul desproteïnizada em meio alcalino com KOH/ <i>blue crab waste chitin deproteinized in alkaline medium with KOH</i>
CS	quitina recuperada do resíduo de siri-azul após a extração da astaxantina utilizando CO <sub>2</sub> supercrítico a 30 MPa e 313,15 K/ <i>blue crab waste recovered chitin after astaxanthin extraction using supercritical CO<sub>2</sub> at 30 MPa and 313.15 K</i>
CS-E	quitina recuperada do resíduo de siri-azul após a extração da astaxantina utilizando CO <sub>2</sub> supercrítico a 30 MPa e 313,15 K e etanol como cossolvente/ <i>blue crab waste recovered chitin after astaxanthin extraction using supercritical CO<sub>2</sub> at 30 MPa and 313.15 K and ethanol as co-solvent</i>

CSH-AE	quitina recuperada do resíduo de siri-azul após a extração da astaxantina utilizando o método de soxhlet e etanol:acetona, 50:50 v/v, como solvente/ <i>blue crab waste recovered chitin after astaxanthin extraction using soxhlet method and ethanol:acetone, 50:50 v/v, as solvent</i>
CSH-E	quitina recuperada do resíduo de siri-azul após a extração da astaxantina utilizando o método de soxhlet e etanol como solvente/ <i>blue crab waste recovered chitin after astaxanthin extraction using soxhlet method and ethanol as solvent</i>
DD	grau de deacetilação/ <i>deacetylation degree</i>
DERS	quitina do resíduo de siri-azul desmineralizada antes da recuperação dos carotenoides e desproteïnizada em meio alcalino com KOH/ <i>blue crab waste chitin demineralized before carotenoid recovery and deproteinized in alkaline medium with KOH</i>
DH	<i>degree of hydrolysis</i>
DHA	ácido docosahexanóico/ <i>docosahexanoic acid</i>
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DMSO	dimetilsulfóxido/ <i>dimethyl sulfoxide</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazina/ <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil</i>
DRX	difração de raios X/ <i>X-ray diffraction</i>
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
DTGS	<i>deuterated triglycine sulfate</i>
DTGS	detector de sulfato de triglicina deuterado/ <i>deuterated triglycine sulfate detector</i>
E/S	enzima/substrato
EC <sub>50</sub>	concentração das amostras necessária para captar 50% do radical livre/ <i>effective concentration at 50%</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético/ <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EE%	eficiência de encapsulamento/ <i>encapsulation efficiency</i>
EPA	ácido ecosapentanóico/ <i>eicosapentaenoic acid</i>
ESC	extração supercrítica
EtOH	etanol/ <i>ethanol</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FTIR	espectroscopia no IR com transformada de Fourier/ <i>mid-Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GD	grau de desacetilação
GH	grau de hidrólise
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>
HCl	ácido clorídrico

HEA	quitina do resíduo de siri-azul desproteïnizada com a enzima alcalase/ <i>blue crab waste chitin deproteinized with alcalase enzyme</i>
HEB	quitina do resíduo de siri-azul desproteïnizada com bromelina/ <i>blue crab waste chitin deproteinized with bromelain enzyme</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hx	hexano/ <i>hexane</i>
Hx:IPA	hexano:isopropanol/ <i>hexane:isopropyl alcohol</i>
IPA	isopropanol/ <i>isopropyl alcohol</i>
KBr	brometo de potássio/ <i>potassium bromide</i>
KOH	hidróxido de potássio/ <i>potassium hydroxide</i>
LABCAL	Laboratório de Análises - UFSC
LATESC	Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica - UFSC
LCP	Laboratório de Controle de Processos - UFSC
LPE	<i>low pressure extractions</i>
Mac	maceração/ <i>maceration</i>
MDCK	células de rim canino/ <i>madin-darby canine kidney</i>
MEM	meio Eagle modificado/ <i>modified Eagle's médium</i>
MEV	microscopia eletrônica de varredura/ <i>scanning electron microscope</i>
MTT	método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio/ <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay</i>
$\overline{M}_v$	massa molecular viscosimétrica média/ <i>viscosity average molecular weight</i>
NaCl	cloreto de sódio/ <i>sodium chloride</i>
NaOH	hidróxido de sódio/ <i>sodium hydroxide</i>
PBS	tampão fosfato salino/ <i>phosphate buffered saline</i>
PDI	índice de polidispersividade/ <i>polydispersity index</i>
SEM	<i>scanning electronic microscopy</i>
SFE	<i>supercritical fluid extraction</i>
Sox	Soxhlet
TCA	ácido tricloroacético/ <i>trichloroacetic acid</i>
TG	análise termogravimétrica
UE	ultrassom/ <i>ultrasound extraction</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
US\$	dólar americano
UV-Vis	ultravioleta-visível/ <i>ultravioletvisible</i>

Wtr                    *water*  
X<sub>0</sub>                    *rendimento global/global yield*

Siglas utilizadas nas nanoformulações

BC                    *nanoformulações utilizando quitosana do resíduo de siri-azul/nanoformulations using blue crab waste chitosan*  
C                      *nanoformulações utilizando quitosana comercial/nanoformulations using commercial chitosan*  
NCH                  *nanoformulações formuladas com solução de quitosana a 0,50 mg/mL/nanoformulations formulated with 0.50 mg/mL chitosan solution*  
NCL                  *nanoformulações formuladas com solução de quitosana a 0,25 mg/mL/nanoformulations formulated with 0.25 mg/mL chitosan solution*  
NE                    *nanoemulsões/nanoemulsions*  
UN                    *partículas descarregadas/unloaded particles*

## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 1: INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
1.1 OBJETIVOS.....	31
1.1.1 Objetivo Geral.....	31
1.1.2 Objetivos Específicos.....	31
1.2 Estrutura do documento.....	32
<b>Capítulo 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
2.1 Processamento de siri-azul e resíduos produzidos.....	35
2.2 Quitina e quitosana.....	38
2.2.1 Extração de quitina e obtenção de quitosana.....	40
2.2.2 Encapsulamento de compostos com quitosana.....	41
2.3 CAROTENOIDES.....	44
2.3.1 Astaxantina.....	45
2.3.2 Técnicas de recuperação de carotenoides em crustáceos.....	47
2.4 Recuperação de proteína do resíduo de crustáceos.....	51
2.5 Encapsulamento de compostos bioativos.....	53
2.5.1 Encapsulamento por emulsificação espontânea.....	56
2.6 Citotoxicidade de EXTRATOS naturais.....	58
2.7 Considerações a respeito do estado da arte.....	59
<b>Capítulo 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>63</b>
3.1 Preparo da matéria-prima.....	63
3.2 Caracterização da matéria-prima.....	64
3.2.1 Umidade e substâncias voláteis.....	64
3.2.2 Nitrogênio total.....	64
3.2.3 Cinzas.....	65
3.2.4 Lipídios.....	65
3.3 Desproteínização enzimática.....	66
3.3.1 Determinação do Grau de Hidrólise (GH).....	68
3.3.2 Caracterização da fração solúvel (hidrolisado proteico).....	69

3.4 Técnicas convencionais de recuperação de astaxantina.....	69
<b>3.4.1 Extração em Soxhlet (Sox).....</b>	<b>70</b>
<b>3.4.2 Extração por Maceração (Mac).....</b>	<b>70</b>
<b>3.4.3 Extração assistida por ultrassom (UE).....</b>	<b>71</b>
3.5 Recuperação de EXTRATO RICO EM astaxantina com fluido supercrítico.....	71
3.6 Caracterização dos extratos.....	74
<b>3.6.1 Determinação de carotenoides totais como astaxantina.....</b>	<b>74</b>
<b>3.6.2 Atividade antioxidante.....</b>	<b>75</b>
3.6.2.1 Método do radical DPPH.....	75
3.6.2.2 Método espectrofotométrico de descoloração do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	76
<b>3.6.3 Perfil de ácidos graxos.....</b>	<b>77</b>
3.7 recuperação de quitina e quitosana.....	78
<b>3.7.1 Recuperação de quitina.....</b>	<b>78</b>
<b>3.7.2 Desacetilação da quitina.....</b>	<b>78</b>
<b>3.7.3 Caracterização da quitosana.....</b>	<b>79</b>
3.7.3.1 Análise do grau de N-desacetilação.....	79
3.7.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	79
3.7.3.3 Análise termogravimétrica (TG).....	79
3.7.3.4 Análise de difração de Raios X (DRX).....	80
3.7.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	80
3.7.3.6 Massa molecular viscosimétrica média (Mv).....	80
3.8 Nanoformulações.....	81
<b>3.8.1 Tamanho de partícula e potencial Zeta.....</b>	<b>82</b>
<b>3.8.2 Eficiência de encapsulamento (EE%).....</b>	<b>83</b>
3.9 Citotoxicidade.....	83
<b>3.9.1 Cultura celular.....</b>	<b>83</b>
<b>3.9.2 Método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).....</b>	<b>84</b>
3.10 Análise estatística.....	85

<b>Capítulo 4: HIDROLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DE SIRI-AZUL (<i>Callinectes sapidus</i>) PARA OBTENÇÃO DE QUITINA, PROTEÍNA E EXTRATO RICO EM ASTAXANTINA.....</b>	<b>87</b>
4.1 INTRODUCTION.....	88
4.2 MATERIALS AND METHODS.....	89
<b>4.2.1 Raw material.....</b>	<b>89</b>
<b>4.2.2 Blue crab waste characterization.....</b>	<b>89</b>
<b>4.2.3 Enzymatic deproteinization.....</b>	<b>90</b>
4.2.3.1 Degree of hydrolysis (DH) determination.....	91
4.2.3.2 Soluble fraction characterization.....	92
<b>4.2.4 Carotenoid recovery.....</b>	<b>92</b>
4.2.4.1 Determination of total carotenoids as astaxanthin.....	93
4.2.4.2 Antioxidant activity.....	93
<b>4.2.5 Chitin recovery.....</b>	<b>94</b>
<b>4.2.6 Chitin characterization.....</b>	<b>94</b>
4.2.6.1 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	94
4.2.6.2 Thermogravimetric analysis (TG).....	94
4.2.6.3 Scanning Electronic Microscopy (SEM).....	94
<b>4.2.7 Statistical analyses.....</b>	<b>95</b>
4.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	95
<b>4.3.1 Enzymatic hydrolysis.....</b>	<b>95</b>
<b>4.3.2 Carotenoid recovery.....</b>	<b>98</b>
<b>4.3.3 Chitin recovery.....</b>	<b>100</b>
4.4 Conclusions.....	106
<b>Capítulo 5: RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA NA QUITOSANA DE RESÍDUO DE SIRI-AZUL (<i>Callinectes sapidus</i>).....</b>	<b>109</b>
5.1 Introduction.....	110
5.2 Materials and methods.....	112
<b>5.2.1 Raw material.....</b>	<b>112</b>
<b>5.2.2 Low pressure extractions (LPE).....</b>	<b>112</b>
5.2.2.1 Soxhlet (Sox).....	113
5.2.2.2 Maceration (Mac).....	113
5.2.2.3 Ultrasound assisted (UE).....	114

<b>5.2.3 Supercritical fluid extraction (SFE)</b> .....	<b>114</b>
<b>5.2.4 Total carotenoids as astaxanthin</b> .....	<b>115</b>
<b>5.2.5 Antioxidant activity</b> .....	<b>115</b>
5.2.5.1 Free radical scavenging activity (DPPH).....	115
5.2.5.2 $\beta$ -carotene bleaching method.....	116
<b>5.2.6 Chitin Recovery</b> .....	<b>116</b>
<b>5.2.7 N-Acetylation of chitin</b> .....	<b>117</b>
<b>5.2.8 Chitosan characterization</b> .....	<b>117</b>
5.2.8.1 N- deacetylation degree (DD).....	117
5.2.8.2 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	117
5.2.8.3 Thermogravimetric analysis (TG).....	118
5.2.8.4 X-ray diffraction (XRD).....	118
5.2.8.5 Scanning Electronic Microscopy (SEM).....	118
<b>5.2.9 Statistical Analysis</b> .....	<b>118</b>
5.3 Results and discussion.....	118
<b>5.3.1 SFE with pure CO<sub>2</sub></b> .....	<b>118</b>
<b>5.3.2 Global yield (X<sub>0</sub>) of SFE and LPE</b> .....	<b>120</b>
<b>5.2.3 Astaxanthin recovery and antioxidant activity</b> .....	<b>124</b>
<b>5.3.4 Influence of depigmentation (astaxanthin extraction) methods on chitosan extracted from blue crab waste</b> .....	<b>130</b>
5.4 CONCLUSIONS.....	139
 <b>Capítulo 6: NANOENCAPSULAMENTO DE EXTRATO RICO EM ASTAXANTINA E ÁCIDOS GRAXOS DO RESÍDUO DE SIRI-AZUL (<i>Callinectes sapidus</i>) EM MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA E ESTUDO DA CITOTOXICIDADE</b> .....	
6.1 Introduction.....	142
6.2 MATERIAL AND METHODS.....	144
<b>6.2.1 Astaxanthin and fatty acids recovery</b> .....	<b>144</b>
6.2.1.1 Astaxanthin content.....	144
6.2.1.2 Fatty acids profile.....	145
<b>6.2.2 Chitosan recovery</b> .....	<b>145</b>
6.2.2.1 N-deacetylation degree (DD).....	146
6.2.2.2 Viscosity average molecular weight.....	146
<b>6.2.3 Preparation of nanoformulations</b> .....	<b>146</b>
6.2.3.1 Size and zeta potential.....	148



6.2.3.2 Encapsulation efficiency.....	149
<b>6.2.4 Cytotoxicity.....</b>	<b>149</b>
6.2.4.1 Cell culture.....	149
6.2.4.2 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay.....	150
<b>6.2.5 Statistical analyses.....</b>	<b>151</b>
6.3 Results and discussion.....	151
<b>6.3.1 Raw material characterization.....</b>	<b>151</b>
6.3.1.1 BC-AST.....	151
6.3.1.2 Chitosan.....	154
<b>6.3.2 Nanoformulations.....</b>	<b>154</b>
<b>6.3.4 Cytotoxicity.....</b>	<b>160</b>
6.4 CONCLUSIONS.....	163
<b>Capítulo 7: CONCLUSÕES.....</b>	<b>165</b>
7.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	167
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>169</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>193</b>



## DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

### Por quê?

1. A disposição do resíduo de processamento de siri-azul é um problema socioambiental
2. O resíduo de siri-azul possui compostos bioativos que podem ser recuperados
3. O encapsulamento da astaxantina pode melhorar suas características e proteger o composto da degradação

### O que consta na literatura?

1. Um trabalho internacional foi encontrado respeito da recuperação de astaxantina do resíduo de processamento de siri-azul
2. Não constam na literatura trabalhos sobre a extração de hidrolisado proteico do resíduo de siri-azul
3. Não foi encontrado na literatura trabalho sobre o encapsulamento de astaxantina em matriz polimérica de quitosana, ambos extraídos do resíduo de siri-azul
4. Não foram encontrados trabalhos com a determinação da citotoxicidade do extrato do resíduo de siri-azul

### Hipóteses?

1. É possível recuperar compostos bioativos do resíduo de siri-azul?
2. Enzimas proteolíticas podem ser utilizadas na desproteíntização do resíduo de siri-azul na obtenção de quitina?
3. É possível nanoencapsular o extrato de resíduo de siri-azul em quitosana?

### Principais métodos experimentais

1. Desproteíntização enzimática
2. Técnicas convencionais de recuperação de astaxantina
3. Recuperação de astaxantina com fluido supercrítico
  4. Determinação da atividade antioxidante
  5. Concentração de astaxantina nos extratos
    6. Perfil de ácidos graxos
    7. Recuperação de quitosana
    8. Caracterização da quitosana
9. Nanoencapsulamento do extrato em quitosana

### Respostas

1. Selecionar o método mais eficiente na recuperação de astaxantina e atividade antioxidante dos extratos
2. Nanoencapsular o extrato em quitosana, ambos recuperados do resíduo de siri-azul
3. Avaliar a citotoxicidade do extrato e das nanocápsulas em células MDCK



## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Os crustáceos estão entre os produtos marinhos mais rentáveis economicamente. Em 2014, foram processados cerca de 7 milhões de toneladas de crustáceos no mundo (FAO, 2016). O siri-azul (*Callinectes sapidus*) é um crustáceo pertencente à família Portunidae e devido a sua carne adocicada e macia, muito apreciada na culinária, está entre os crustáceos mais comercializados mundialmente. No Brasil, ele pode ser encontrado em grande parte da costa litorânea. O IBAMA estima que em 2011 foram processadas 2.292,9 t de siri em todo Brasil, mas esse número pode ser maior devido à pesca extrativa artesanal, esta difícil de ser contabilizada (IBAMA, 2011).

A industrialização de siri-azul para a remoção da sua carne gera uma grande porção de resíduo altamente perecível, pois apenas 28% do animal é destinado ao consumo humano. Existem poucos dados a respeito da destinação do resíduo de processamento de siri-azul, já que grande parte do seu processamento ocorre de forma artesanal. Sendo assim, estima-se que parte desse resíduo seja destinado à produção de ração animal e a outra parte descartada inadequadamente em estuários, baías, lagoas e no mar (LEFFLER, 1997; YAN; CHEN, 2015).

O resíduo de processamento de siri-azul possui compostos bioativos que podem ser utilizados como insumo na indústria alimentícia, farmacêutica, nutracêutica, de nutrição animal, entre outras. Dentre os principais compostos com potencial econômico no resíduo de siri-azul, estão: (a) quitina; (b) aminoácidos essenciais; e (c) carotenoides (BABU; CHAKRABARTI; SAMBASIVARAO, 2008; HIGUERA-CIAPARA et al., 2004; S., 2011; SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2005; SENPHAN; BENJAKUL; KISHIMURA, 2014).

Depois da celulose, a quitina é o segundo polímero natural mais abundante no planeta. Para o uso industrial, principalmente na área biomédica, a quitina é convertida em quitosana. A quitosana é resultante da desacetilação da quitina, possui aplicações em diversas áreas e pode ser produzida, dependendo das suas características, em várias conformações como, filmes, géis, cápsulas, fibras etc (RINAUDO, 2006). A desproteínização do resíduo de crustáceos em geral, para a obtenção de quitina, é comumente realizada por hidrólise alcalina com o emprego de altas temperaturas. Esse método gera um concentrado proteico de baixo valor nutritivo que, na maioria das vezes, é descartado sem valor comercial. Uma alternativa eficiente para a recuperação das proteínas no processo de desproteínização é o método que envolve a

hidrólise enzimática do resíduo de crustáceos por meio de enzimas proteolíticas (CAHÚ et al., 2012; GILDBERG; STENBERG, 2001).

Outro importante composto obtido por meio do resíduo de crustáceos são os carotenoides, o principal deles a astaxantina. A astaxantina é uma xantofila que possui alta capacidade de pigmentação (coloração vermelho-alaranjado) e atividade antioxidante, principalmente quando obtida de fontes naturais (SKULBERG, 2004). Dependendo da técnica de extração, são obtidos junto aos carotenoides importantes ácidos graxos úteis na prevenção de doenças cardiovasculares, como o  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9 (LATYSHEV et al., 2009).

A extração dos carotenoides, e consequentemente dos ácidos graxos, a partir de fontes naturais, é realizada tradicionalmente com solventes orgânicos. Estas técnicas geralmente envolvem altas temperaturas de processo, o que pode ocasionar alterações químicas e destruição de compostos termossensíveis, assim como a perda de qualidade do extrato. A extração de carotenoides com fluido supercrítico (ESC) é uma tecnologia com crescente aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica. O processo consiste na utilização de um fluido supercrítico cujas propriedades físico-químicas estão entre um líquido e um gás. Uma das principais características desta tecnologia é o aumento da qualidade dos extratos através da exploração da seletividade do processo (BRUNNER, 1994; FRANÇA et al., 1999).

Como a maioria dos carotenoides, a astaxantina é uma molécula altamente insaturada e pode ser facilmente degradada por processos térmicos e/ou oxidativos durante sua fabricação e estocagem. Já a quitosana vem sendo utilizada como um polímero eficaz para a formação de nanocápsulas. Sendo assim, o encapsulamento da astaxantina em matriz de quitosana pode ser uma alternativa viável para manter a astaxantina presente nos extratos em condições estáveis de isomerização e pigmentação durante a sua estocagem (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004).

A utilização do resíduo do processamento de crustáceos como fonte alternativa na obtenção de compostos que futuramente podem ser empregados como insumo em outras indústrias tem um apelo ambiental e social. A extração de compostos com importância tecnológica e biológica apresenta-se como uma alternativa ambientalmente correta de aproveitamento destes resíduos. Assim, a retirada deste poluente do meio ambiente como fonte alternativa de subprodutos tem vantagens, como a aproveitamento de um poluente, e a possibilidade de uma nova fonte de renda para pequenos pescadores artesanais, que poderiam

comercializar, além da carne do animal, as partes não destinadas ao consumo humano.

Assim, frente ao exposto, faz-se necessária a investigação de métodos que permitam o máximo aproveitamento do resíduo de processamento de siri-azul, uma matéria-prima pouco explorada cientificamente e que pode trazer importantes contribuições, tanto tecnológica como economicamente.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o potencial do resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*) como fonte de compostos bioativos e realizar o encapsulamento de extrato rico em astaxantina em matriz polimérica de quitosana, ambos compostos recuperados do resíduo de siri-azul.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Recuperar e caracterizar a fração proteica, a quitina e o extrato rico em astaxantina obtidos a partir do resíduo de siri-azul hidrolisado com enzimas proteolíticas, alcalase e bromelina;
- b) Avaliar o rendimento global de extração e a eficiência na recuperação de astaxantina através de técnicas convencionais e alta pressão, a partir do resíduo de siri-azul;
- c) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos ricos em astaxantina obtidos utilizando técnicas convencionais e a alta pressão;
- d) Avaliar a cinética de extração das curvas de ESC de extratos de siri-azul;
- e) Selecionar e avaliar a aplicação de cossolventes ao CO<sub>2</sub> no processo de ESC e avaliar o efeito do cossolvente na extração, em termos de rendimento global, concentração de astaxantina e atividade antioxidante dos extratos;
- f) Obter quitosana a partir do resíduo da extração das técnicas com melhores eficiências na recuperação de astaxantina;
- g) Caracterizar as quitosanas, quanto ao grau de desacetilação, morfologia e propriedades térmicas, obtidas a partir do resíduo de siri-azul;

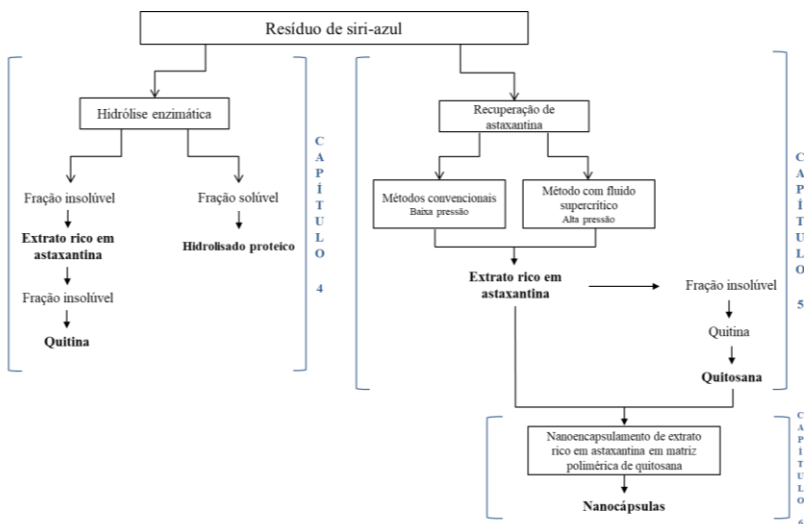
- h) Selecionar, entre as técnicas convencionais e a alta pressão, o método mais eficiente de despigmentação e obtenção de quitosana;
- i) Avaliar o perfil de ácidos graxos do extrato obtido pela técnica que apresentou maior eficiência de despigmentação e obtenção de quitosana do resíduo de siri-azul;
- j) Nanoencapsular através do método de emulsificação espontânea o extrato rico em astaxantina em matriz polimérica de quitosana, obtidos pelo processo mais eficiente na recuperação dos mesmos;
- k) Avaliar as nanoformulações obtidas dos compostos (extrato rico em astaxantina e ácidos graxos e quitosana) do resíduo de siri-azul, quanto à eficiência de encapsulamento, tamanho de partícula, índice de polidispersividade e citotoxicidade às células saudáveis de rim canino (MDCK).

## 1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: no Capítulo 1 é apresentado a introdução e objetivos da presente tese de doutorado, retratado acima. O Capítulo 2 descreve a revisão bibliográfica com uma visão geral a respeito do processamento de siri-azul (*Callinectes sapidus*), principais compostos que podem ser recuperados a partir do resíduo deste processamento, encapsulamento de compostos bioativos e citotoxicidade de extratos naturais. No Capítulo 3 é apresentado os materiais e métodos utilizados nas atividades experimentais realizadas. Os Capítulos 4, 5 e 6 (Fluxograma geral – Figura 1.1) apresentam, na forma de artigos, os trabalhos elaborados nesta tese, sendo que: o Capítulo 4 trata da hidrólise enzimática do resíduo de siri-azul para obtenção de diferentes compostos; o Capítulo 5 descreve o estudo de recuperação de astaxantina por diferentes técnicas; e o Capítulo 6 avalia o nanoencapsulamento do extrato rico em astaxantina em matriz polimérica de quitosana, ambos extraídos do resíduo de siri-azul. Por fim, o Capítulo 7 apresenta as conclusões gerais de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.



Figura 1.1 – Fluxograma geral dos trabalhos produzidos nesta tese dividido em capítulos.





## CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

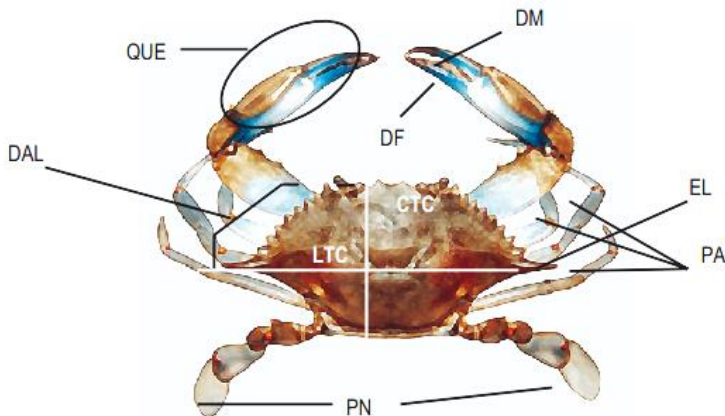
O Capítulo 2 apresenta uma breve revisão do estado da arte no qual o presente trabalho se insere, buscando evidenciar a relevância do tema sob investigação. Inicialmente, será apresentado uma visão geral a respeito do processamento de siri-azul (*Callinectes sapidus*) e sobre os principais compostos que podem ser recuperados a partir do resíduo deste processamento. Posteriormente, será descrito uma breve explanação sobre o encapsulamento de compostos com atividades biológicas e a respeito da citotoxicidade de extratos naturais.

### 2.1 PROCESSAMENTO DE SIRI-AZUL E RESÍDUOS PRODUZIDOS

O siri-azul (*Callinectes sapidus*) ou siri-tinga, pertencente à família Portunidae, gênero *Callinectes*, possui uma ampla distribuição global e pode ser encontrado em água costeiras das Américas, Europa e Japão (MELO, 1996). A família Portunidae possui 293 espécies (NG; GUINOT; DAVIE, 2008), das quais, 16 (5%) ocorrem no Brasil (MELO, 1996). *Callinectes sapidus*, *C. danae*, *C. bocourti*, *C. ornatos*, *C. exasperatus*, *C. marginatus* e *C. similis* são as principais espécies encontradas e habitam água salobras em manguezais, estuarinas e hipersalinas (MELO, 1996; VIRGA, 2006).

Segundo Virga (2006) as espécies do gênero *Callinectes* sp. possuem morfologia muito semelhante. Conforme a Figura 2.1, os animais são achatados dorso-ventralmente tendo a largura da carapaça duas vezes o comprimento do corpo. Possuem carapaça de cor azul esverdeada ou verde acinzentada no dorso com grânulos na região dorsal, distribuídos de acordo com as espécies. Apresentam dois espinhos (E) nas laterais da carapaça e nove dentes antero-laterais (DAL) triangulares. A porção móvel da antena não é excluída da órbita. O corpo do quelípodo (QUE) não possui espinho mesodistal; quilípodos de tamanhos moderados e grandes, com dois dedos, sendo o superior fixo (DF) e o inferior móvel (DM) com coloração dimórfica sexual.

Figura 2.1- Siri-azul gênero *Callinectes*. EL – espinhos laterais. DAL – dentes antero-laterais; DM – dedo móvel do quelípedo; DF – dedo fixo do quelípedo; QUE – quelípedo; LTC – largura total da carapaça (horizontal, e espinho a espinho); CTC – comprimento total do corpo (vertical); PA – patas ambulatórias ou pereiópodo; PN – pata natatória ou pleópodo.



Fonte: Virga (2006).

Os hábitos alimentares do siri-azul dependem da disponibilidade do alimento no ambiente. Geralmente a alimentação é baseada em matéria orgânica morta de animais e vegetais, mas pequenos peixes, invertebrados bentônicos e outros crustáceos também são parte da dieta desses crustáceos (MANTELATTO; CHRISTOFOLETTI, 2001; VIRGA, 2006).

Em 2012 foram processados 6.446.818 t de crustáceos no mundo, o que corresponde a 9,7% do processamento total de pescado, e um valor econômico correspondente a 22,4% (US\$ 30,9 bilhões) do total (FAO, 2014). Já em 2014, o processamento global anual foi de 6.915.073 t (US\$ 36,2 bilhões), um aumento de aproximadamente 3% em relação a 2012 (FAO, 2016).

Em muitas comunidades pesqueiras no Brasil o siri tem grande importância econômica, pois é utilizado como recurso pesqueiro. A distribuição do siri na costa brasileira se estende do Rio de Janeiro ao Rio grande do Sul, chegando até a costa Atlântica Argentina (SANTOS, 2007). No Brasil, em 2014, o processamento de frutos do mar do grupo dos crustáceos foi de 65.100,0 t, o que caracterizou um aumento de 7,0% em relação a 2009 (60.475 t), e de 15,8% se comparada a 2008, quando o valor foi de 54.830 t (FAO, 2016). Já o processamento especificamente de siri teve um aumento de 39% entre os anos de 2007

(1.461,0 t) e 2009 (2.405,5 t), em 2010 (2.274,4 t) e 2011 (2.292,9 t) o processamento praticamente se manteve constante (MPA, 2012).

Tendo em vista que grande parte do siri comercializado atualmente é obtida por meio de pesca extrativa artesanal, especialistas consideram que há um conjunto de problemas na geração de informações de dados a respeito da captura e processamento que podem interferir na segurança dos dados obtidos, como: (a) as fontes de produção são espalhadas por extensa área e, na quase totalidade, em locais de difícil acesso; (b) as capturas são praticadas por pesca artesanal e, em boa medida, informal; e (c) a forma de arrumação (em cordas) para o transporte e o comércio do produto é uma variável que dificulta a estimativa do total capturado (IBAMA, 2011). Conseqüentemente, o processamento de siri no Brasil deve ser maior que o contabilizado, tornando-se evidente a falta de fiscalização nos pontos de pesca, inclusive, não há informações na bibliografia a respeito do descarte dos resíduos.

Na industrialização de crustáceos é gerada uma grande quantidade de resíduo altamente perecível, já que grande parte do corpo dos animais, como, carapaça, cabeça e patas, não são destinadas ao consumo humano (LEFFLER, 1997). Sachindra, Bhaskar e Mahendrakar (2006) relataram que apenas 28% do siri vivo resulta em alimento para consumo humano, sendo o restante normalmente destinado a indústria de ração animal. Devido à grande parte da pesca e processamento de siri advir da informalidade há uma grande chance de o resíduo ser tratado de forma inadequada, sendo descartado no meio ambiente.

Anualmente são descartadas em todo o mundo, bilhões de toneladas de cascas de crustáceos nos oceanos, e a degradação deste resíduo se dá de forma lenta, fazendo com que o descarte indevido contribua para o aumento da poluição ambiental (FANIMO et al., 2000; LEFFLER, 1997; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991).

Há uma vasta gama de compostos bioativos que podem ser obtidos a partir do resíduo de processamento de crustáceos. Existem diversos estudos científicos que relatam a identificação, desenvolvimento de processos e aplicação desses compostos (BATAILLE; BATAILLE, 2008; MEZZOMO et al., 2011; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991). A maioria desses estudos estão relacionados ao resíduo de camarão e há uma escassez de dados referente a extração de compostos bioativos do resíduo de siri.

Entre os principais compostos que podem ser extraídos do resíduo de crustáceos estão: (a) quitina, que pode facilmente ser

transformada em quitosana pela sua desacetilação alcalina, tendo esta diversas aplicações principalmente na indústria alimentícia e farmacêutica (GOYCOOLEA et al., 2000; JAYAKUMAR et al., 2010; RINAUDO, 2006); (b) carotenoides, entre os quais está a astaxantina, que pertence ao grupo das xantofilas, um composto com alta atividade antioxidante e amplamente utilizada na indústria de alimentação de salmonídeos (HIGUERA-CIAPARA; FÉLIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006); (c) hidrolisado proteico, com alto teor de aminoácidos essenciais (GIGLIOTTI; JACZYNSKI; TOU, 2008; MACH; NGUYEN; NORTVEDT, 2009; SPINELLI; LEHMAN; WIEG, 1974); e (d) ácidos graxos, principalmente o ácido graxo poli-insaturado ômega 3, cujo consumo por seres humanos está relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares (HARRIS; POSTON; HADDOCK, 2007; KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2003).

## 2.2 QUITINA E QUITOSANA

Depois da celulose, a quitina ( $\beta$ -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina) é o biopolímero mais abundante encontrado na natureza. Este biopolímero é encontrado no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos, em insetos e em invertebrados como, esponjas, celenterados, nemátodos e moluscos (MERZENDORFER, 2009; MOURA; SCHMIDT; PINTO, 2006).

A quitina possui alguns diferenciais perante outros polissacarídeos naturais. A maioria dos polissacarídeos de ocorrência na natureza, como a celulose, ácido algínico, ágar, agarose e carragena, são neutros ou ácidos, enquanto a quitina é um exemplo de polissacarídeo altamente alcalino, sendo ainda hidrofóbico e insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (KUMAR, 2000).

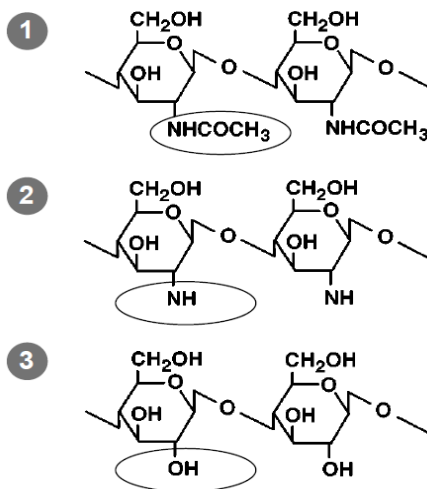
A carapaça de crustáceos é a fonte mais importante de quitina para o uso comercial, este fato deve-se ao seu alto conteúdo e fácil extração. Os resíduos de crustáceos marinhos possuem uma grande quantidade de quitina, em torno de 14 - 30% (HANSEN; ILLANES, 1994). Estima-se que sejam produzidos por ano 250 bilhões de toneladas de resíduo proveniente de crustáceos e que a produção anual mundial total de quitina (proveniente de diversas fontes) seja de aproximadamente  $10^{10}$  -  $10^{12}$  t (BRÜCK; SLATER; CARNEY, 2010; GORTARI; HOURS, 2013; ISLAM; KHAN; TANAKA, 2004; MORGANTI; MORGANTI; MORGANTI, 2011). O resíduo proveniente de crustáceos é considerado nocivo, pois possui alta perecibilidade e efeito poluente quando descartado tanto no mar quanto

na terra. No mar, ele rapidamente leva à eutrofização, enquanto em terra causa preocupações ambientais e de saúde pública, sendo rapidamente colonizado por agentes patogênicos e organismos de deterioração (ISLAM; KHAN; TANAKA, 2004; MORGANTI; MORGANTI; MORGANTI, 2011)

A quitosana é o derivado da quitina mais utilizado na indústria, ela é comumente obtida através da mudança estrutural da quitina por hidrólise alcalina. A quitosana é um polímero biodegradável, biocompatível e possui aplicações em diferentes áreas, como agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), indústria alimentícia (fibras dietéticas, conservante para molhos, antimicrobiano e recobrimento de frutas), indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar e creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, redutor de colesterol, hemostático e anticoagulante). Porém, sua maior aplicação é na área biomédica (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato e encapsulamento de materiais) (AZEVEDO et al., 2007; RINAUDO; DOMARD, 1989).

Na Figura 2.2 são apresentadas as estruturas químicas da quitina (1), quitosana (2) e celulose (3), onde pode-se verificar que apenas um grupo funcional (em círculo) difere entre as moléculas.

Figura 2.2 - Estruturas químicas da quitina (1), quitosana (2) e celulose (3).



Fonte: Leffler (1997).

### 2.2.1 Extração de quitina e obtenção de quitosana

Comumente a extração da quitina segue três etapas básicas: (a) desmineralização: ocorre através de tratamento ácido, podem ser utilizados o HCl (mais comum), HCOOH, H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, HNO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COOH; (b) desproteínização: podem ser utilizados diversos álcalis, como NaOH (mais utilizado), KOH, Na<sub>2</sub>S, NaHSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaCO<sub>3</sub>, CaHSO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; e (c) despigmentação: normalmente realizada com solventes orgânicos, por extração com fluido supercrítico e branqueamento. A ordem das etapas pode ser diferente devido a diferença entre as matérias-primas e metodologias (GOYCOOLEA et al., 2000; PENICHE; ARGÜELLES-MONAL; GOYCOOLEA, 2008; PUVVADA; VANKAYALAPATI; SUKHAVASI, 2012).

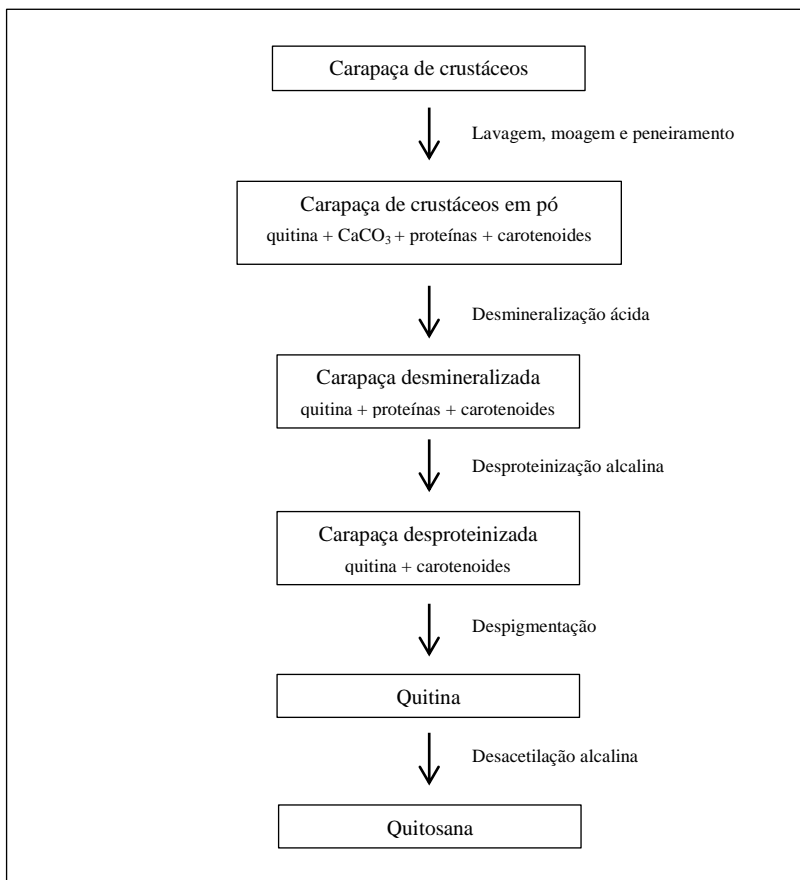
Devido às diferenças estruturais de cada material, estes tratamentos devem ser específicos para cada fonte de quitina. A quitina extraída deve ser classificada em termos de pureza e cor, pois proteínas residuais e pigmentos podem causar problemas, principalmente em produtos biomédicos (RINAUDO, 2006).

Através da N-desacetilação alcalina da quitina, forma-se a quitosana, um polímero de cadeia linear de glucosamina e N-acetilglucosamina (MUZZARELLI et al., 1997). A desacetilação parcial da quitina em estado sólido pode ser feita sob condições alcalinas (NaOH concentrado) ou por hidrólise enzimática em presença de uma quitina desacetilase (RINAUDO, 2006).

A Figura 2.3 representa um esquema de extração de quitina e obtenção de quitosana a partir de carapaças de crustáceos.



Figura 2.3 - Extração de quitina e sua N-desacetilação, para a obtenção de quitosana.



Fonte: Adaptado de Sagheer et al. (2009).

### 2.2.2 Encapsulamento de compostos com quitosana

A quitosana tem algumas vantagens sobre outros polímeros encapsulantes, pois (a) é um produto natural; (b) possibilita a liberação gradual de vários fármacos; (c) tem a habilidade de aderir à mucosa gástrica; (d) não é tóxica; (e) é biodegradável e biocompatível; e (f) normalmente, não causa reações alérgicas (ESTEVINHO et al., 2013). Essas características a tornam atraente para aplicações em medicina,

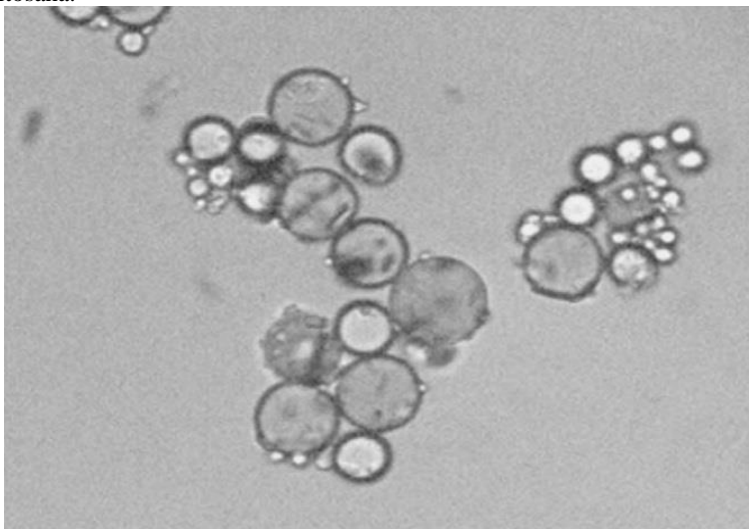
farmacêutica e em indústrias alimentícias (HIRANO et al., 1987; LIANG et al., 2017; RAFIQUE et al., 2016).

Diversos estudos científicos e patentes relatam a utilização de quitosana como agente encapsulante de diferentes substâncias. Trabelsi et al. (2013) encapsularam um probiótico (*Lactobacillus plantarum* TN8) com alginato recoberto com quitosana e testaram a exposição das bactérias em condições gastrointestinais artificiais. Os autores concluíram que o encapsulamento das bactérias fez com que a resistência das mesmas aumentasse significativamente em sucos gastrointestinais artificiais e ainda foi notada uma proteção efetiva das células durante o aquecimento a 338,15 K e refrigeração a 277,15 K, em um período de 30 min.

O encapsulamento de suco de frutas com quitosana também foi relatado na literatura. Bastos et al. (2012) encapsularam suco de caju, natural e comercial, por *spray drying*, utilizando o sistema quitosana-proteína isolada do leite, com o objetivo de estabilizar físico-quimicamente o produto. O diâmetro médio das partículas obtidas no estudo foi de 0,2 a 5,0  $\mu\text{m}$  para o suco comercial e 0,2 a 40,0  $\mu\text{m}$  para o suco natural. Os sucos encapsulados demonstraram alta estabilidade físico-química dos componentes avaliados (vitamina C e coloração), quando comparados com as amostras controle o suco natural teve uma maior estabilidade quando comparado ao suco comercial, ambos encapsulados.

Higuera-Ciapara et al. (2004) encapsularam astaxantina sintética em matriz polimérica de quitosana utilizando o método de emulsão múltipla/evaporação do solvente. No trabalho foram obtidas cápsulas esféricas (Figura 2.4) com um diâmetro entre 5 - 50  $\mu\text{m}$  e o rendimento do processo (quantidade de astaxantina microencapsulada/astaxantina utilizada) foi de 92%. A astaxantina encapsulada se manteve em condições estáveis de isomerização e pigmentação durante uma estocagem de 8 semanas a diferentes temperaturas, 298,15 K; 308,15 K e 318,15 K.

Figura 2.4 - Micrografia (100x) de microcápsulas de astaxantina em matriz de quitosana.



Fonte: Higuera-Ciapara et al. (2004).

Outros estudos ainda relatam o uso da quitosana como agente encapsulante para polifenóis (LIANG et al., 2017), testosterona (CHANPHAI; TAJMIR-RIahi, 2017), óleos essenciais de tomilho, menta e cominho (BEYKI et al., 2014; KHALILI et al., 2015; ZHAVEH et al., 2015), hidrolisado proteico de salmão (LI; PAULSON; GILL, 2015), eugenol (WORANUCH; YOKSAN, 2013), curcumina (SOWASOD et al., 2012), palmitato de ascorbilo (éster de vitamina C solúvel em óleo) (YOKSAN; JIRAWUTTHIWONGCHAI; ARPO, 2010), risperidona, um fármaco antipsicótico (MUDHAKIR; WIBISONO; RACHMAWATI, 2014), catequina de Gambier (KAILAKU; MULYAWANTI; ALAMSYAH, 2014) e extrato de *Agrobacterium radiobacter* (ARANAZ; ACOSTA; HERAS, 2009).

As técnicas empregadas para o encapsulamento de substâncias com quitosana incluem gelatinização ionotrópica, emulsificação, *spray drying*, coacervação, entre outras. A combinação de técnicas também é utilizada com o objetivo de obter partículas com propriedades e funcionalidade específicas (ESTEVINHO et al., 2013; PENICHE et al., 2003).

## 2.3 CAROTENOIDES

Quimicamente, os carotenoides são poliisoprenóides e podem ser divididos em dois grupos principais: (a) carotenos ou carotenoides hidrocarbonetos, compostos apenas de átomos de carbono e hidrogênio; e (b) xantofilas, que são derivados oxigenados hidrocarbonetos, tais como hidróxi, ceto, epoxi, metoxi ou grupos de ácido carboxílico. Sua característica estrutural é um sistema de ligação dupla conjugada, o que influencia as suas propriedades químicas, bioquímicas e físicas (QUIRÓS; COSTA, 2006).

Atualmente, existem muitos estudos comprovando as propriedades dos carotenoides em retardar ou prevenir doenças degenerativas como a aterosclerose (KARPPI et al., 2013), câncer (BERTRAM; VINE, 2005; NISHINO et al., 2000; SMITH, 1998), envelhecimento (LADEMANN et al., 2011; STAHL; SIES, 2005) e doenças oculares (BERNSTEIN et al., 2010; PRATT, 1999).

A habilidade de prevenir doenças dos carotenoides está relacionada com sua atividade antioxidante, protegendo células e tecidos dos danos oxidativos (STAHL; SIES, 2005). A maioria dos estudos a respeito da determinação da atividade antioxidante dos carotenoides é focado no betacaroteno, porém estudos demonstram que outros carotenoides possuem atividade antioxidante mais efetiva que o mesmo, como a astaxantina, relatada com poder antioxidante dez vezes superior ao betacaroteno e cem vezes ao  $\alpha$ -tocoferol (MIKI, 1991).

A prevenção de doenças relacionada aos carotenoides também está ligada ao fato de que seus metabólitos podem influenciar a expressão de certos genes ou inibir enzimas regulatórias (STAHL; SIES, 2005). No estudo realizado por Karas et al. (2000) o licopeno inibiu o crescimento de células humanas de câncer de mama. A inibição da proliferação dessas células foi relacionada com o impedimento na progressão do ciclo celular aparentemente relacionada a diminuição do receptor de sinalização IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1).

Além de prevenir e retardar doenças, os carotenoides, devido a sua coloração que varia entre o amarelo e vermelho, são utilizados como corantes. Na indústria alimentícia possuem a função de colorir ou intensificar a cor dos alimentos (RIZK; EL-KADY; EL-BIALY, 2014) e na indústria farmacêutica eles são aplicados em cápsulas de medicamentos e cosméticos (MÜNZEL, 1981).

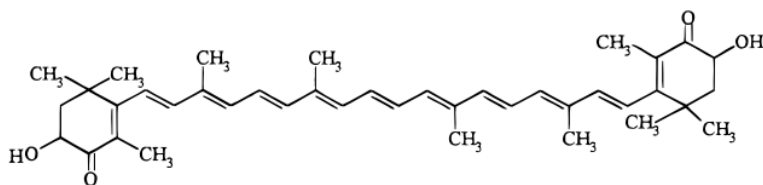
Em formulações comerciais, os carotenoides utilizados podem ser de dois tipos: extratos naturais e corantes sintéticos idênticos aos

naturais. Segundo Skulberg (2004) os carotenoides obtidos naturalmente são mais resistentes ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades.

### 2.3.1 Astaxantina

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ - $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) é um pigmento carotenoide do grupo das xantofilas de fórmula  $C_{40}H_{52}O_4$  e o principal componente responsável pela coloração rosa-alaranjada nos músculos de salmonídeos e alguns crustáceos. Naturalmente os carotenoides são sintetizados apenas pelos vegetais, enquanto os animais obtêm os mesmos pela alimentação (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). A Figura 2.5 apresenta a estrutura química da astaxantina.

Figura 2.5 – Estrutura química da astaxantina.



Fonte: Naguib (2000).

A astaxantina é o principal pigmento carotenoide encontrado em animais aquáticos e está presente em muitos frutos do mar, incluindo salmão, siri, truta, camarão, lagosta e ova de peixes. Também está presente em aves como flamingos e codornizes. Na maioria dos animais aquáticos no qual ela se encontra, a astaxantina possui várias funções biológicas essenciais, incluindo a proteção à oxidação de ácidos graxos poli-insaturados essenciais, proteção contra os efeitos de luz UV, resposta imune e pigmentação (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

Na maioria dos crustáceos a astaxantina está presente em todo corpo do animal. Sendo assim, os resíduos de crustáceos também possuem esse carotenoide, em quantidades que podem variar de 50 a 200 mg por kg de resíduo (QUIRÓS; COSTA, 2006).

A extração de pigmentos do resíduo de crustáceos é uma importante alternativa econômica e tecnológica. Ela normalmente é

realizada com solventes orgânicos, mas outras técnicas vêm sendo empregadas atualmente, como a extração com fluido supercrítico (FÉLIX-VALENZUELA et al., 2001; MEZZOMO et al., 2011) e utilizando óleos comestíveis tanto de origem vegetal quanto animal (HINOSTROZA et al., 1997; MEZZOMO et al., 2011).

A identificação desta xantofila pode ser realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado ao espectrômetro de massa, com detectores de ultravioleta-visível (UV-Vis) ou de arranjo de fotodiodos ou com espectrofotômetro UV-Vis.

O mercado global de astaxantina sintética e natural para alimentação de peixes na aquicultura, nutracêuticos, cosméticos e alimentos e bebidas foi estimado em 280 t, avaliadas em US \$ 447 milhões em 2014, e deverá atingir 670 t avaliadas em US \$ 1,1 bilhão até 2020 (RESEARCH AND MARKETS, 2015). Atualmente, o comércio de astaxantina é baseado na sua forma sintética com aplicações na aquicultura. A astaxantina sintética é produzida de fontes petroquímicas, sendo questionável o seu uso do ponto de vista da segurança alimentar, poluição e sustentabilidade. Este tipo de astaxantina só pode ser utilizada na pigmentação de alimentos para pescados, não sendo permitida a sua utilização na alimentação e suplementação humana (LI et al., 2011; PANIS; CARREON, 2016). Assim, o uso de astaxantina natural extraída do resíduo de crustáceos pode minimizar problemas de poluição ambiental, substituir a astaxantina sintética e melhorar economicamente a indústria pesqueira e pequenos produtores locais.

Os atributos mais importantes da astaxantina são a sua capacidade de pigmentação e o seu potencial antioxidante. As diversas funções biológicas da astaxantina tem atraído interesse devido aos benefícios à saúde humana (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003).

A astaxantina é capaz de proteger tecidos contra a foto-oxidação de luz UV. Os olhos e a pele são as partes do corpo humano que mais sofrem com os danos oxidativos causados pela luz UV, sendo assim, a astaxantina é um importante aliado para a foto-proteção desses importantes componentes do corpo humano (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003; PAPAS, 1998).

Gross e Lockwood (2004) estudaram os efeitos do disuccinatodissódico de astaxantina (*Cardax*<sup>TM</sup>) como agente cardioprotetor usando o modelo de Sprague-Dawley de infarto do miocárdio em ratos. Foram aplicadas, por meio de injeção em uma das veias da calda dos ratos, doses diárias (25, 50 e 75 mg/kg) durante 4 dias. *Cardax*<sup>TM</sup> na concentração de 50 e 75 mg/kg por 4 dias resultaram

em uma redução média na área de risco de  $35 \pm 3\%$  (41% de proteção) e  $26 \pm 2\%$  (56% de proteção), respectivamente. Os autores concluíram que a astaxantina sintética (disuccinatodissódico de astaxantina) pode ser útil em aplicações clínicas onde o pré-tratamento de pacientes com risco de infarto do miocárdio é realizado.

O extrato de resíduo de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) foi capaz de reduzir os níveis de colesterol, triglicerídeos e glicose em ratos, indicando que o extrato possui potencial efeito antiobesidade e hipolipidêmico (MEZZOMO et al., 2015).

Hussein et al. (2007) estudaram o efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos. No estudo, astaxantina foi administrada por via oral durante 7 semanas. Os autores concluíram que apenas 5 mg/kg de astaxantina são capazes de reduzir em 9% a pressão sanguínea arterial média.

É possível ainda que a astaxantina também desempenhe um papel importante na quimioprevenção do câncer. Em um estudo desenvolvido por Bates et al. (1985) a astaxantina inibiu em até 40% a proliferação de células de tumor mamário. Células de câncer de cólon humanas também foram inibidas com astaxantina em experimentos *in vitro* (ONOGI et al., 1998).

A astaxantina também pode contribuir na diminuição no nível de glicose no sangue. Camundongos diabéticos que receberam suplementação de 0,02% de astaxantina durante 12 semanas mostraram uma leve diminuição no nível de glicose no sangue, quando comparados com os camundongos que não receberam a suplementação (NAITO et al., 2004).

### **2.3.2 Técnicas de recuperação de carotenoides em crustáceos**

Atualmente, grande parte do resíduo de crustáceos que é reaproveitado é destinado para a produção de ração animal e uma pequena parte designada a produção de quitina, nesta última, sendo que os carotenoides, juntamente com os outros compostos são descartados. Diversos estudos tem relatado que os carotenoides podem ser facilmente recuperados do resíduo de crustáceos empregando-se diferentes técnicas de recuperação (HOLANDA; NETTO, 2006; MEZZOMO et al., 2011; ÖZOĞUL, 2000; SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2005, 2006).

A técnica empregada na recuperação dos carotenoides influencia diretamente na composição e atividade biológica dos extratos obtidos.

Devido à alta complexidade das matérias-primas e os diferentes tipos de carotenoides existentes em cada uma delas, não existe apenas um método padrão para a recuperação dos carotenoides. No entanto, a maioria dos métodos de extração visa a liberação dos compostos de interesse da sua matriz por meio da ruptura de tecidos (FERREIRO-VERA et al., 2011).

As técnicas convencionais de recuperação de carotenoides comumente utilizam solventes orgânicos, mas a seleção do solvente adequado para cada tipo de matéria-prima nem sempre é fácil, pois os carotenoides possuem polaridades diferentes, e a estrutura da matriz analítica também desempenha um papel importante na escolha do solvente. Normalmente, solventes apolares, como o hexano, são utilizados na recuperação de carotenoides apolares (carotenos) ou esterificados, enquanto os solventes polares, como a acetona e o etanol, são indicados para carotenoides com característica polar (xantofilas), como a astaxantina (AMORIM-CARRILHO et al., 2014).

A suscetibilidade dos carotenoides também deve ser levada em consideração na escolha do método de extração. Os carotenoides costumam ser relativamente estáveis quando estão na matriz, mas quando isolados podem sofrer oxidação pela luz, calor, ácido e exposição ao oxigênio (AMORIM-CARRILHO et al., 2014).

Técnicas tradicionais de recuperação de carotenoides, como em Soxhlet, maceração e assistida por ultrassom, são comumente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia na obtenção de variados extratos e podem utilizar uma ampla gama de solventes como acetona, álcool benzílico, acetato de etila, hexano, isopropanol, metanol, metil-etil-cetona e etanol (DE CAMPOS et al., 2008).

A extração em Soxhlet é um método contínuo, considerado um caso particular da lixiviação (processo de extração de uma substância presente em componentes sólidos através da sua dissolução em um líquido), onde o processo de extração ocorre através da recirculação contínua do solvente e a operação é repetida até a extração completa (LAU; GAN; NG, 2010). A vantagem desse processo é que a amostra está sempre em contato com o solvente em constante renovação. Além disso, o equipamento apresenta baixo custo, não há necessidade de filtração ao final do processo, é uma metodologia simples e requer pouco treinamento (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

As maiores desvantagens da extração em Soxhlet é o longo período necessário para a extração e a grande quantidade de solvente utilizada, o que representa prejuízo econômico e um problema ambiental. Além disso, as amostras são extraídas no ponto de ebulição



do solvente durante longos períodos, o que pode causar degradação térmica dos compostos termolábeis e ao final do processo há necessidade de eliminação do solvente. Finalmente, essa técnica é limitada pelo tamanho do extrator e sua difícil automatização (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

A técnica de extração por maceração consiste em colocar a matéria-prima (em pedaços grosseiros ou em pó) em contato com o solvente em um recipiente fechado, a temperatura ambiente, por um período pré-estabelecido de tempo com agitação frequente. Após o período de extração a amostra é filtrada e o solvente, normalmente é eliminado (SINGH, 2008). Este método é simples e de fácil realização, entretanto, requer um alto volume de solvente orgânico, sendo assim, é necessário um bom gerenciamento de resíduos. Além disso, são necessários longos períodos de extração, a sua eficiência é baixa e há necessidade de eliminação do solvente (AZWANIDA, 2015).

A extração assistida por ultrassom envolve o uso de ondas ultrassônicas de 20 kHz a 2000 kHz. O efeito mecânico de cavitação acústica do ultrassom aumenta a superfície de contato entre o solvente e a matéria-prima e a permeabilidade das paredes celulares (AZWANIDA, 2015). A agitação das moléculas provoca ainda um aumento de temperatura que favorece a solubilidade e difusividade de compostos no meio. A associação desses fenômenos aumenta a transferência de massa e modifica o equilíbrio de fases diminuindo o tempo necessário para extração, se comparado com o mesmo processo na ausência de ultrassom (MA et al., 2008).

A extração assistida por ultrassom é um procedimento simples e relativamente de baixo custo, podendo ser utilizada em pequena e grande escala. Esse método possui outras vantagens, como o baixo consumo de solvente e reduzido tempo de extração. Entretanto, o uso de ondas ultrassônicas acima de 20 kHz pode causar a formação de radicais livres (AZWANIDA, 2015).

Algumas técnicas modernas de extração de carotenoides têm sido desenvolvidas nos últimos anos com objetivo de melhorar a eficiência, utilizar menor quantidade de solvente, diminuir a degradação dos compostos, aumentar a seletividade e facilitar a automação. Entre essas técnicas está a extração com fluido supercrítico (ESC). A ESC é um processo que proporciona seletividade e eficiência com menor risco de degradação térmica dos extratos e cujo solvente pode ser facilmente removido no final da extração (BRUNNER, 1994; MACHMUDAH; WAHYUDIONO; GOTO, 2015; MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2009) .

A ESC tem sido descrita como uma tecnologia ambientalmente segura para a recuperação de compostos comumente extraídos de fontes naturais, incluindo plantas, subprodutos, algas, entre outros (WANG; WELLER, 2006). Este método consiste basicamente de duas etapas: solubilização dos compostos presentes na matriz sólida e separação desses do solvente supercrítico. Durante a extração, o solvente flui através do leito de partículas, solubilizando os compostos presentes na matriz vegetal. O solvente sai do extrator carregando as substâncias solubilizadas, e por meio da redução da pressão, ocorre a separação do extrato e do solvente (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Para a realização da ESC, diversos fatores devem ser levados em consideração. Esses fatores incluem a seleção do fluido supercrítico, preparação do material (umidade, diâmetro de partícula, etc.), utilização ou não de cossolvente e condições de extração (WANG; WELLER, 2006).

A escolha do solvente é muito importante para a obtenção de extratos de boa qualidade. Além disso, o solvente deve ser não-inflamável e atóxico (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2011). O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono - CO<sub>2</sub> (propriedades críticas: 304,25 K e 7,38 MPa). O CO<sub>2</sub> é barato, seguro e apresenta alta difusividade combinada com força de solvente facilmente ajustável. Na temperatura e pressão ambiente o CO<sub>2</sub> é gasoso, o que torna a recuperação do analito simples e livre de solventes. Além disso, na preparação de amostras de produtos naturais e alimentos é importante a capacidade de operar em baixas temperaturas em meio não oxidante, o que permite a extração de compostos termicamente lábeis e/ou facilmente degradáveis (BRUNNER, 1994; HERRERO et al., 2010).

Uma das principais desvantagens do CO<sub>2</sub> supercrítico é que ele apresenta um poder de solvatação limitado quando se tratam de solutos polares (HAWTHORNE; MILLER, 1987). Segundo Hawthorne e Miller (1987), a adição de um modificador orgânico, também chamado de cossolvente, pode aumentar substancialmente a eficiência de extração pelo aumento da solubilidade dos compostos de interesse, reduzindo suas interações com a matriz ou alterando estas de alguma forma e facilitando a extração. Embora a astaxantina não seja considerada uma molécula fortemente polar, ela possui alto peso molecular (PM=596,8) prejudicando a sua solubilidade no CO<sub>2</sub> (DANDGE; HELLER; WILSON, 1985). Sendo assim, o uso de cossolvente pode auxiliar na extração de astaxantina utilizando a técnica de ESC.

Sánchez-Camargo et al. (2012) obtiveram aumento significativo na extração de lipídios e astaxantina de resíduo de camarão rosa (*P.*

*paulensis*) utilizando 5% de etanol como cossolvente, com condições de extração de 30 MPa e 323,15 K.

O rendimento na extração de astaxantina de *Phaffia rhodozyma* teve um aumento de 9 e 24% a temperatura de 313,15 e 333,15 K, respectivamente, utilizando etanol a 15% como cossolvente na ESC a 50 MPa (LIM et al., 2002).

López et al. (2004) obtiveram um aumento na extração de astaxantina de resíduo do processamento de lagostim utilizando etanol a 15% como cossolvente na ESC.

Trabalhos recentes mostram que a utilização de enzimas no pré-tratamento da amostra pode aumentar o rendimento na extração de carotenoides de resíduos de crustáceos (BABU; CHAKRABARTI; SAMBASIVARAO, 2008; NAWANI; PRAKASH; KAPADNIS, 2010; SACHINDRA; MAHENDRAKAR, 2011). Babu, Chakrabarti, Sambasivarao (2008) obtiveram um aumento de 50 µg/g para 705 µg/g e 987 µg/g na quantidade total de carotenoides utilizando pepsina e tripsina, respectivamente, no pré-tratamento do resíduo de camarão (*Penaeus monodon*).

## 2.4 RECUPERAÇÃO DE PROTEÍNA DO RESÍDUO DE CRUSTÁCEOS

Devido ao seu alto conteúdo de aminoácidos essenciais, as carapaças de diversos crustáceos podem ser utilizadas como fonte de proteína na dieta de seres humanos e na alimentação animal (GIGLIOTTI; JACZYNSKI; TOU, 2008; MACH; NGUYEN; NORTVEDT, 2009; SPINELLI; LEHMAN; WIEG, 1974).

Cerca de 15 a 40% do resíduo de crustáceos é composto por proteína (HANSEN; ILLANES, 1994) e a produção e utilização de hidrolisados proteicos advindos deste material pode ser uma medida viável para melhorar o gerenciamento destes resíduos.

Usualmente, a desproteínização do resíduo de crustáceos para a obtenção de quitina é realizada com a utilização de álcalis fortes e aquecimento, normalmente com temperaturas acima de 363,15 K, o que pode causar degradação de alguns aminoácidos (KRISTINSSON; RASCO, 2000). Sendo assim, o uso de proteases comerciais tem sido proposto na desproteínização do resíduo de crustáceos, com consequente obtenção de hidrolisados proteicos de alto valor nutricional (CAHÚ et al., 2012; GILDBERG; STENBERG, 2001; SIMPSON et al., 1998). Na Tabela 2.1 pode ser observado a composição centesimal de hidrolisados obtidos de diferentes crustáceos.

A hidrólise enzimática do resíduo de crustáceos para a obtenção de hidrolisado proteico é um método baseado na adição de enzimas, sob condições controladas, para a clivagem das proteínas, com a vantagem de ocorrer sob condições brandas e sem produzir produtos de degradação (HOLANDA, 2004).

Tabela 2.1 - Composição centesimal de hidrolisados obtidos de diferentes crustáceos.

Espécie	Proteína (%)	Cinzas (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)
Resíduo de camarão ( <i>Xiphopenaeus kroyeri</i> ) <sup>1</sup>	81,58 ± 0,00	13,53 ± 0,23	-	1,71 ± 0,08
Resíduo de camarão rosa ( <i>Parapenaeus longirostris</i> ) <sup>2</sup>	80,80 ± 0,21	14,40 ± 0,14	-	2,74 ± 0,30
Camarão Kuruma ( <i>Penaeus japonicus</i> ) <sup>3</sup>	92,67 ± 0,30	2,31 ± 0,21	4,69 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Camarão Veludo ( <i>Metapenaeopsis acclivis</i> ) <sup>3</sup>	84,93 ± 0,39	5,74 ± 0,16	9,27 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Krill Antártico ( <i>Euphausia superba</i> ) <sup>3</sup>	86,16 ± 0,23	5,66 ± 0,11	8,14 ± 0,02	0,03 ± 0,02

<sup>1</sup>Holanda e Netto (2006); <sup>2</sup>Sila et al. (2014); <sup>3</sup>Zhang, Yamashita e Nozaki (2002).

Os hidrolisados proteicos obtidos de crustáceos se diferem em suas propriedades físico-químicas e atividades biológicas dependendo da sua sequência de aminoácidos e do peso molecular que os compõem. Suas propriedades nutricionais e funcionais têm sido analisadas com o objetivo de obter peptídeos biologicamente ativos (ANAL; NOOMHORM; VONGSAWASDI, 2013).

Existem poucos estudos na literatura a respeito da composição dos aminoácidos presentes no resíduo de crustáceos e não foi encontrado estudo a respeito do resíduo siri-azul.

Lage -Yusty et al. (2011) realizaram um estudo de composição do resíduo de caranguejo das neves (*Chionoectes opilio*), os aminoácidos encontrados foram metionina, arginina, treonina, triptofano, histidina, isoleucina, lisina, leucina, valina e fenilalanina.

Valores consideráveis de aminoácidos, como ácido glutâmico, arginina, lisina, glicina, alanina e leucina, foram observados por Zhang, Yamashita e Nozaki (2002) em hidrolisado proteico de krill antártico (*Euphausia superba*).

Sila et al. (2014) encontraram altas porcentagens de aminoácidos essenciais, como arginina, lisina, histidina e leucina em hidrolisado proteico de resíduo de camarão rosa (*Parapenaeus longirostris*), demonstrando um alto valor nutricional com base no perfil de aminoácidos.

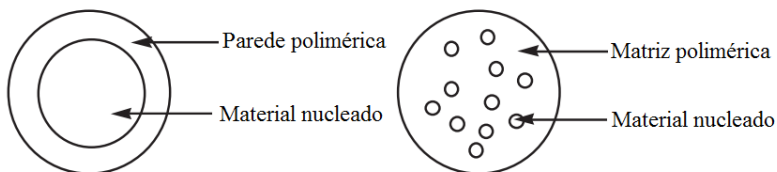
## 2.5 ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

O encapsulamento consiste no recobrimento ou incorporação de um composto ou mistura (encapsulado) em um material ou sistema (encapsulante). Essa técnica permite proteger o encapsulado de oxidação e degradação térmica, controlar sua taxa de liberação sob determinadas condições, evitar volatilização, inibir crescimento microbológico, melhorar a qualidade sensorial e proporcionar aumento da solubilidade e biodisponibilidade, devido às alterações causadas na superfície dos compostos (FANG; BHANDARI, 2012; GÖKMEN et al., 2011; KAISER et al., 2015; NIELSEN et al., 2016).

Os encapsulados, como micropartículas e nanopartículas poliméricas, são classificadas com base nas suas dimensões. O diâmetro médio das micropartículas varia de 1 a 250  $\mu\text{m}$ , enquanto que o diâmetro médio das nanopartículas varia de 10 a 1000 nm (MUNDARGI et al., 2008).

Diferentes morfologias podem ser geradas no processo de encapsulamento, mas duas ocorrem com mais frequência (Figura 2.6): na primeira (Figura 2.6 - esquerda), conhecida como microcápsula, o composto ativo fica aprisionado no centro envolvido em uma parede polimérica, formando uma estrutura nucleada. Na segunda morfologia (Figura 2.6 - direita), o composto está distribuído em toda a matriz polimérica (FANG; BHANDARI, 2010).

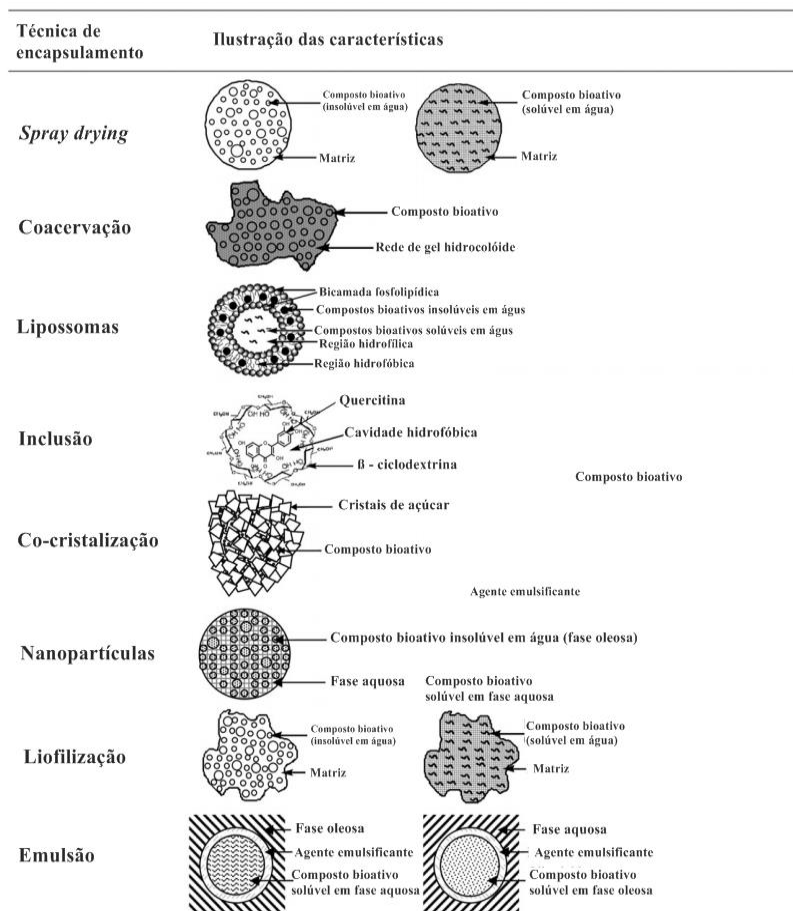
Figura 2.6 – Principais morfologias de encapsulados: microcápsula (esquerda); microesfera (direita).



Fonte: Adaptado de Fang e Bhandari (2010).

Os compostos bioativos podem ser encapsulados por diferentes técnicas e a sua escolha depende, entre outros fatores, da natureza do polímero e do composto a ser encapsulado, o uso pretendido e as propriedades desejadas no produto final (JAIN, 2000). As técnicas clássicas de precipitação empregadas para a formação de cápsulas, incluem *spray drying*, coacervação, lipossomas, cocristalização, liofilização e emulsão (FANG; BHANDARI, 2010). Cada técnica forma encapsulados com diferentes características e suas propriedades de aplicação e funcionalidade são dependentes do tamanho, da distribuição de tamanho e da morfologia da partícula. A Figura 2.7 apresenta as características de partículas encapsuladas por diferentes técnicas.

Figura 2.7 - Ilustração de compostos bioativos encapsulados, produzidos por diferentes técnicas de encapsulamento.



Fonte: Adaptado de Fang e Bhandari (2010).

A seleção do polímero encapsulante é um dos fatores mais importantes no encapsulamento de compostos para obtenção da efetividade e funcionalidade desejada das cápsulas. Alguns dos critérios mais importantes para a seleção do agente encapsulante são:

- Propriedade reológica compatível com a técnica aplicada;
- Habilidade de dispersar ou emulsionar o encapsulado e estabilizar a emulsão produzida.

- c) Não possuir reatividade com o material a ser encapsulado durante o processamento e armazenamento por períodos prolongados;
- d) Garantir que o encapsulado permaneça ativo dentro da sua estrutura;
- e) Ter a habilidade de liberar o solvente e outros materiais utilizados durante o processo de encapsulamento;
- f) Proporcionar proteção ao encapsulado contra condições ambientais (oxigênio, calor, luz e umidade);
- g) Possuir baixo custo (DESAI; JIN PARK, 2005).

Para a aplicação em indústrias alimentícias e farmacêuticas os polímeros utilizados como agente encapsulante podem ser de origem sintética ou natural (JAIN, 2000).

Entre os polímeros naturais mais utilizados como encapsulantes estão os polissacarídeos, como o amido e seus derivados (amilose, amilopectina, dextrinas, maltodextrinas, polidextrose e celulose), exsudatos e extratos de plantas (goma arábica, goma karaya, goma de mesquita, galactomananas, pectina e polissacarídeos de soja), extratos marinhos (carragena e alginato), polissacarídeos microbianos e animais (dextrano, quitosana, xantana e gelana). Entre os materiais lipídicos adequados para aplicação encontram-se ácidos graxos, ceras (cera de abelha, cera de carnaúba e cera de candelila), glicerídios e fosfolipídios (WANDREY; BARTKOWIAK; HARDING, 2010).

Dentre os polímeros sintéticos comumente utilizados estão, os derivados do ácido láctico e glicólico, poli(dioxanona), copolímeros de policarbonato de trimetileno e homopolímeros e copolímeros de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003).

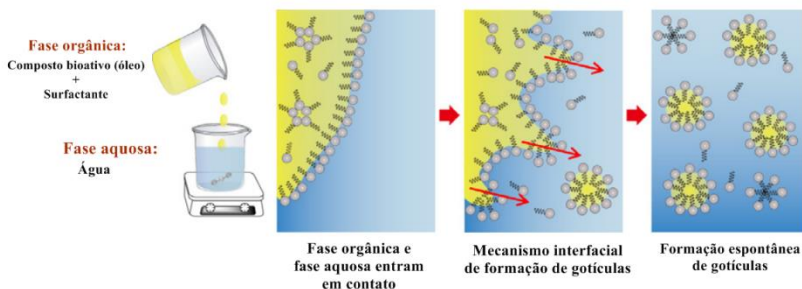
### **2.5.1 Encapsulamento por emulsificação espontânea**

A técnica de emulsificação espontânea é de fácil reprodutibilidade e amplamente utilizada em diversos grupos de pesquisa atualmente (BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005; CALVO et al., 1997; GOVENDER, 1999; GOYCOOLEA et al., 2012; MURAKAMI et al., 1999). Essa técnica consiste na formação de um núcleo homogêneo, formado pelo composto bioativo, inicialmente dissolvido em uma fase orgânica, acetona e etanol, adicionados a uma fase aquosa, formando uma nanoemulsão óleo e água (o/a), estabilizada por um surfactante adsorvido na interface o/a. Subsequente ou durante a formação da nanoemulsão, um polímero solúvel em água pode ser incorporado com o objetivo de revestir a nanoemulsão, efetivamente formando nanocápsulas (GOYCOOLEA et al., 2012). O mecanismo de



migração do surfactante da fase orgânica para fase aquosa, que permite a formação espontânea das gotículas da nanoemulsão está representado na Figura 2.8.

Figura 2.8 – Representação esquemática do mecanismo de emulsificação espontânea: gotículas de óleo são formadas espontaneamente quando a fase orgânica contendo o surfactante é adicionada à fase aquosa. O surfactante é transferido da fase orgânica para a fase aquosa (setas vermelhas), conduzindo à turbulência interfacial e a formação espontânea de gotículas da nanoemulsão.



Fonte: Adaptado de McClements e Rao (2011).

Uma das vantagens dessa técnica é sua flexibilidade, pois parâmetros como composição das fases, condições ambientais (temperatura, pH e força iônica) e condições de mistura (velocidade de agitação, taxa e ordem de adição) podem ser variados (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

Saberi, Fang e McClements (2013) obtiveram resultados satisfatórios na formação de nanoemulsões enriquecidas com vitamina E por emulsificação espontânea.

Davidov-Pardo e McClements (2015) encapsularam resveratrol em nanoemulsões de óleo de uva por emulsificação espontânea, para a formação de nutracêuticos de liberação controlada. O estudo demonstrou que as emulsões formadas eram fisicamente estáveis em estocagens a diferentes temperaturas e eficientes em proteger o resveratrol da degradação e isomerização causadas pela incidência de luz UV.

Kaiser et al. (2015) observaram que o encapsulamento de capsaicina em quitosana por emulsificação espontânea alterou substancialmente o comportamento do fármaco e que altas concentrações de capsaicina puderam ser aplicadas como nanocápsulas sem induzir o stress celular, o mesmo não ocorria com a utilização apenas de capsaicina.

## 2.6 CITOTOXICIDADE DE EXTRATOS NATURAIS

Existem poucos estudos sobre citotoxicidade de extratos multicomponentes, como extratos de plantas e animais, em células saudáveis. Estes estudos são importantes para fornecer informações sobre as doses a serem administradas na produção de alimentos, medicamentos e suplementos seguros.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* avaliam a toxicidade de um composto ou mistura às células em cultura e esta avaliação normalmente é realizada pela detecção do número de células que permaneceram viáveis após o período de incubação. O método de determinação de citotoxicidade deve ser simples, econômico e deve prever a toxicidade *in vivo* através de um marcador substituto, este deve indicar o número de células viáveis em comparação às amostras controle não tratadas. Os métodos para estimar o número de células viáveis em cultura são usualmente baseados na medição de um indicador de atividade metabólica celular (RISS; MORAVEC; NILES, 2011).

Existem dois mecanismos distintos experimentalmente de morte celular: (a) necrose, que ocorre quando a célula é exposta a uma injúria física ou química; e (b) apoptose, processo natural de morte celular onde são removidas as células ineficazes ou indesejáveis. A citotoxicidade é a propriedade de um composto químico, como um alimento, cosmético ou fármaco, ou uma célula mediadora (células *natural killer* T), de destruir células independentemente dos mecanismos de morte celular (ROCHE, 2008).

Em busca por um método rápido e quantitativo capaz de avaliar um grande número de amostras, em 1983, Mosmann desenvolveu, em substituição aos métodos radioativos, um método colorimétrico (MOSMANN, 1983) capaz de quantificar células viáveis em um meio de cultura. O espectrofotômetro de varredura múltipla (ELISA) pode medir um grande número de amostras com elevada precisão, assim Mosmann investigou a possibilidade de utilizar este equipamento para a medição de metabolismos celulares que gerassem reações colorimétricas. Esta técnica é amplamente utilizada atualmente (CAO et al., 2008; FANKAM et al., 2017; GERLIER; THOMASSET, 1986; KAISER et al., 2015; LIU et al., 2008; MOHSENIBANDPI et al., 2017; PAUL; KUNDU, 2013).

Células mortas são incapazes de metabolizar vários sais de tetrazólio, isso o torna um reagente viável para a utilização em métodos colorimétricos, já que o anel de tetrazólio é clivado em mitocôndrias ativas, essa reação só ocorre em células vivas. Os sais de tetrazólio são

transformados por enzimas mitocondriais em cristais de formazan, estes podem ser medidos espectrofotometricamente (MOSMANN, 1983).

Um dos sais de tetrazólio mais utilizado nos testes de citotoxicidade é brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), este método é comumente chamado de teste do MTT (GERLIER; THOMASSET, 1986).

O teste do MTT é amplamente utilizado atualmente, principalmente para identificar potenciais medicamentos (naturais e sintéticos) que possam ser utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer.

Rezakhani et al. (2017) utilizando o teste do MTT, observaram uma redução na viabilidade celular de células de câncer de próstata (LNCap) tratadas com extrato de carapaça de caranguejo (*Potamon Persicum*). Doses de 400, 800 e 1000 µg/mL mostraram diferenças significativas na viabilidade celular em comparação com o grupo controle. Em outro estudo os autores demonstraram, pelo teste do MTT, que o extrato de carapaça de caranguejo também é eficaz na inativação de células de câncer mamário, MCF7 (REZAKHANI et al., 2014).

Outros estudos, através do teste do MTT, atestam a efetividade da quitosana e seus derivados na redução da viabilidade celular em sarcoma sólido 180, carcinoma de colo de útero (JEON; KIM, 2002), carcinoma pulmonar A549 (HUANG; KHOR; LIM, 2004), tumor mamário em ratos Wnt-1 (SVIRSHCHEVSKAYA et al., 2016), carcinoma gástrico MGC803 (QI et al., 2005) e linfoma humano SUDHL-4 (PARIDA; ROUT; BINDHANI, 2013).

## 2.7 CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ESTADO DA ARTE

O mercado de cosméticos, nutracêuticos, cosmeceúticos e aditivos para indústria de alimentação humana e animal movimentam bilhões de dólares todos os anos, com excelente perspectiva de crescimento do mercado mundial, com destaque para os produtos naturais. O Brasil possui uma das floras e faunas mais diversificadas do planeta. É detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida da Terra (PINTO et al., 2002) e apenas o cerrado brasileiro possui 5% da biodiversidade do planeta (MMA, [s.d.]). No entanto, o mercado de suplementos e aditivos alimentares de fontes naturais no Brasil, segue pouco explorado, e um dos motivos é a falta de pesquisas consistentes acerca da extração e caracterização de compostos em potencial.

Os compostos bioativos de fontes naturais também podem ser encontrados em partes de plantas e animais não destinados ao mercado

consumidor, ou seja, estão presentes em resíduos industriais. O Brasil é um dos maiores produtores de commodities do mundo e toneladas de resíduos são geradas todos os anos. Na maioria das vezes estes resíduos possuem um destino subvalorizado ou indevido, acarretando danos sociais e ambientais.

Devido a sua extensa costa litorânea o Brasil processa toneladas de crustáceos todos os anos. Atualmente, o resíduo do processamento de crustáceos, quando descartado adequadamente, é comercializado com baixo valor e utilizado no processamento de produtos destinados a alimentação animal. Para que haja a sobrevalorização desse resíduo, são necessárias pesquisas sobre os métodos de extração, otimização de processos e caracterização dos compostos bioativos a partir do resíduo de processamentos de crustáceos.

A astaxantina é um pigmento carotenoide encontrado na carne e carapaça de crustáceos. Durante muitos anos esse carotenoide tem sido usado na pigmentação da carne de pescados, mas em 2016, com o aumento das pesquisas relacionadas aos benefícios da astaxantina nos seres humanos, o mercado de astaxantina para aplicação em cosméticos e nutracêuticos superou o mercado de alimentação animal (GRAND VIEW RESEARCH, 2017). Além da astaxantina, o resíduo de crustáceos possui significativamente outros compostos bioativos que podem agregar valor comercial a esse rejeito, como a quitina e o seu conteúdo proteico.

O Brasil processa um grande volume de siri-azul, um crustáceo encontrado em parte do litoral brasileiro. Existem poucos estudos relatados na literatura científica mundial a respeito da recuperação e das técnicas de recuperação de compostos bioativos do resíduo de processamento desse crustáceo. Apenas um trabalho internacional foi encontrado até o momento a respeito da recuperação de astaxantina do resíduo de processamento de siri-azul, mas nenhum trabalho nacional utilizando matéria-prima local. Não foram encontrados trabalhos que relatem a extração de hidrolisado proteico do resíduo de siri-azul com a utilização de enzimas proteolíticas ou ainda do encapsulamento de astaxantina em matriz polimérica de quitosana, ambos extraídos do resíduo de siri-azul. Também não foram encontrados trabalhos relacionados a determinação da citotoxicidade do extrato do resíduo de siri-azul e suas nanocápsulas, em células saudáveis.

Sendo assim, as informações que figuram este documento são de grande interesse para a comunidade científica e industrial e tem como objetivo apresentar relevantes informações sobre o aproveitamento do

resíduo de siri-azul, que devidamente processado, pode agregar valor comercial e trazer benefícios socioambientais.



## CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 PREPARO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima, resíduo do processamento de siri-azul (*Callinectes sapidus*), foi gentilmente cedida por pequenas indústrias de processamento de carne de siri localizadas na cidade de Laguna, no estado de Santa Catarina, Brasil. Para retirada manual da carne, o siri passa por um processo de cocção em água fervente por 10 min. O resíduo, constituído da carapaça e patas do animal foi coletado uma única vez em novembro de 2014. A matéria-prima foi armazenada em embalagens de polietileno transparente e estocada em freezer na temperatura de 255,15 K (Freezer 220, Cònsul, Brasil) até a realização dos ensaios.

O preparo da matéria-prima foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Holanda e Netto (2006) e Mezzomo et al. (2011). A matéria-prima foi lavada em água corrente e submetida à secagem em estufa com circulação de ar (DL-SE, DeLeo, Brasil) por 8 h a 333,15 K. Logo após a amostra foi triturada em liquidificador doméstico (LiqFaz, Walita, Brasil) com massa (100 g) e tempo (15 s) pré-determinados. Porções de 250 g foram armazenadas em embalagens plásticas de polietileno, especiais para embalar alimentos, e estocadas a temperatura de 253,15 K (Freezer 220, Cònsul, Brasil) até sua utilização.

A Figura 3.1 mostra o resíduo de siri-azul antes (Figura 3.1a) e após (Figura 3.1b) o processo de secagem.

Figura 3.1 – Resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*): (a) preparado na bandeja antes do processo de secagem e; (b) após o processo de secagem.



(a)



(b)

Fonte: do Autor.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima pré-tratada foi caracterizada para: teor de umidade e substâncias voláteis, nitrogênio total, cinzas e lipídios.

### 3.2.1 Umidade e substâncias voláteis

O teor de umidade e substâncias voláteis foi determinado segundo o método n° 925.09 da AOAC (2005), o processo fundamenta-se na perda de umidade e compostos voláteis a 378,15 K. Inicialmente cápsulas de alumínio foram aquecidas em estufa (E.L. 003, Odontobrás, Brasil) a 378,15 K por 60 min, resfriadas em dessecador e mensuradas suas massa. Posteriormente, uma massa de 5 g de resíduo de siri-azul foi alocada nas cápsulas de alumínio aquecidas em estufa a 378,15 K por 180 min, resfriada e pesada. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas de 30 em 30 min até que a massa da amostra tornasse constante. Para o cálculo do teor de umidade e substâncias voláteis, foi utilizada a Equação 3.1.

$$\text{Teor de umidade e voláteis (\%)} = \left( \frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

onde,  $m_i$  é massa inicial de amostra em gramas; e  $m_f$  é a massa final de amostra em gramas.

A determinação da umidade e substâncias voláteis na amostra foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.2 Nitrogênio total

A determinação de nitrogênio total foi realizada segundo o método de Kjeldahl descrito pela AOAC n° 991.20 (2005). O método baseia-se em três etapas; digestão, destilação e titulação. Inicialmente, 6 g de resíduo de siri-azul foram decompostos por aquecimento e transformado em sal amoniacal (etapa de digestão), então a amônia liberada do sal foi recebida em uma solução ácida (ácido sulfúrico 0,05 M) de volume e concentração conhecidos (etapa de destilação). Por fim, a amostra foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M e realizada a determinação quantitativa do nitrogênio total através da equação 3.2.



$$\text{Nitrogênio total} = \frac{V \times 0,14}{M} \quad (3.2)$$

onde,  $V$  é a diferença entre a quantidade de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e de hidróxido de sódio 0,1 M (em mL) utilizados na titulação; e  $M$  é a massa de amostra em gramas.

Para determinação do conteúdo de proteína bruto na amostra o valor de nitrogênio total foi multiplicado pelo fator de conversão 6,25 (A.O.A.C., 2005). Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.3 Cinzas

A análise de cinzas ou resíduo por incineração foi realizada segundo o método n° 900.02 da AOAC (2005). O método consiste em aquecimento da amostra em temperaturas de 823,15 a 843,15 K, isso causa a incineração de toda ou de grande parte da sua matéria orgânica.

Inicialmente, cápsulas de porcelana foram aquecidas em mufla a 823,15 K, resfriadas em dessecador e pesadas. Em seguida, uma massa de 5 g de amostra foi colocada nas cápsulas e incinerada em mufla a 823,15 K, até que as cinzas obtivessem a coloração branca. O teor de cinzas presente na amostra foi calculado através da Equação 3.3.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{N_C \times 100}{M} \quad (3.3)$$

onde,  $N_C$  é a quantidade de cinzas em gramas; e  $M$  é a massa de amostra em gramas.

Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.2.4 Lipídios

A determinação dos lipídios ou extrato etéreo foi realizada segundo a ISO (1973), método n° 1443. Esta metodologia consiste em extração dos lipídios por meio de solvente em aparelho Soxhlet conectado a um condensador tipo bolas e um balão previamente tarado. Uma massa de 5 g de amostra foi colocada em um papel filtro, devidamente fechado, e colocado em um aparelho extrator do tipo Soxhlet. O aparelho Soxhlet foi acoplado a um balão de fundo redondo contendo éter e mantido sob aquecimento em chapa elétrica, por 8 h.

Logo após, o balão com o resíduo extraído foi transferido para uma estufa a 378,15 K e mantido por cerca de 1 h. A operação de aquecimento foi repetida até o balão permanecer em peso constante. O cálculo foi segundo a equação 3.4.

$$\text{Lipídios ou extrato etéreo} = \frac{N_L \times 100}{M}$$

(3.4)

onde,  $N_L$  é a quantidade de lipídios em gramas; e  $M$  é a massa de amostra em gramas.

Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.3 DESPROTEINIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A Figura 3.2 apresenta o fluxograma do processo de recuperação de quitina, do hidrolisado proteico, e da astaxantina a partir do resíduo de siri e empregando desproteínização enzimática (alcalase e bromelina) e alcalina (KOH).

A desproteínização enzimática foi realizada com duas enzimas proteolíticas: ProteMax 750 L (alcalase), uma protease alcalina de origem bacteriana; e Brauzyn BCM (bromelina), enzima extraída do abacaxi capaz de hidrolisar proteínas em polipeptídios de baixo peso molecular, ambas gentilmente fornecidas pela empresa Prozyn (São Paulo, Brasil).

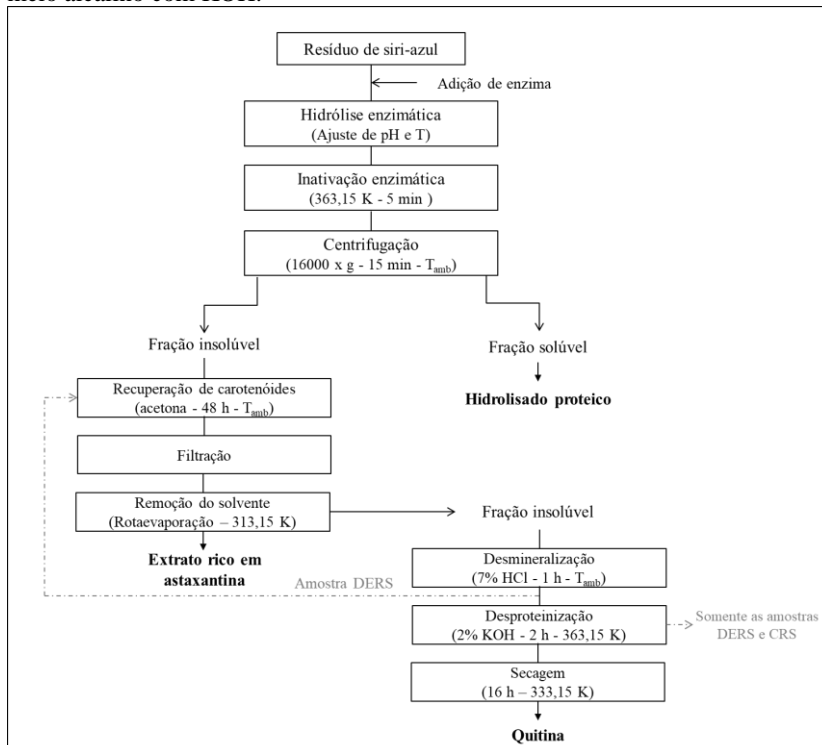
Inicialmente, o resíduo de siri-azul foi diluído em água destilada na proporção de 1:4 (m/v) e as condições de reação de hidrólise utilizadas foram na proporção de 1% e 3% de enzima/substrato (E/S), nas condições de operações ótimas determinadas pelo fabricante, para cada tipo de enzima, pH de 9,0 para a alcalase e pH de 6,0 para a bromelina, ambas na temperatura de 326,15 K. As duas enzimas estudadas foram utilizadas anteriormente em estudos de hidrólise de proteínas em produtos marinhos (HOLANDA; NETTO, 2006; ZHAO et al., 2009). As reações foram realizadas em reator encamisado, acoplado a um banho termostático para o controle de temperatura (MQBTZ 99-20, Microquímica, Brasil). Como o resíduo de siri-azul possui um pH em torno de 9,0, não foi necessário o ajuste de pH durante a reação de hidrólise com a alcalase, já o pH da amostra foi ajustado com HCl 0,1 M para a reação com a bromelina até o pH ótimo de atuação da enzima. O tempo de reação para cada enzima e concentração de (E/S) foram

estipulados a partir dos dados de grau de hidrólise. Após o tempo de reação ser concluído, o resíduo de siri-azul hidrolisado foi aquecido a uma temperatura de 363,15 K por 5 min para inativação enzimática. A fração insolúvel foi separada do sobrenadante por centrifugação (Q222T, Quimis, Brasil) 16000 x g, a temperatura ambiente, por 15 min. O sobrenadante (hidrolisado proteico) foi congelado a 253,15 K e a fração insolúvel seca em liofilizador (L101, LIOTOP, Brasil) por 48 h e posteriormente armazenada em refrigerador doméstico (Freezer 280, Brastemp, Brasil) a 253,15 K até o momento da recuperação dos carotenoides.

As amostras de quitina foram codificadas segundo os procedimentos as quais foram submetidas. CRS: amostra controle (desproteïnizada em meio alcalino – KOH); DERS: amostra desmineralizada antes da recuperação dos carotenoides (desproteïnizada em meio alcalino – KOH); HEA1 e HEA3: resíduo de siri azul desproteïnizado com alcalase 1% e 3% (E/S), respectivamente; HEB1 e HEB3: resíduo de siri azul desproteïnizado com bromelina 1% e 3% (E/S), respectivamente.

As amostras não desproteïnizadas por processo enzimático (CRS e DERS), foram desproteïnizadas em meio alcalino em solução KOH 2%, na proporção de 1:20 (m/v) a 363,15 K por 2 h. Na sequência, as amostras foram lavadas com água destilada até atingir a neutralidade. Por fim, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar DL, DeLeo, Brasil) por 16 h a 333,15 K.

Figura 3.2 - Fluxograma do processo de hidrólise enzimática do resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*) na obtenção de quitina, proteína e astaxantina. CRS: amostra controle (desproteínizada em meio alcalino – KOH); DERS: amostra desmineralizada antes da recuperação dos carotenoides e desproteínizada em meio alcalino com KOH.



### 3.3.1 Determinação do Grau de Hidrólise (GH)

Durante as reações de hidrólise, em tempos pré-determinados de 0 (antes da adição da enzima), 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 min, foram retiradas alíquotas de 1 mL de sobrenadante e a reação foi inativada com 9 mL de ácido tricloroacético (TCA) 6,25%, logo após repouso de 10 min as amostras foram filtradas em papel filtro Whatman nº 40, com o objetivo de remover o material insolúvel precipitado pelo TCA, as proteínas solúveis presentes na solução foram determinadas pelo método espectrofotométrico de Lowry et al. (1951), os valores foram expressos em mg de albumina/mL. O grau de hidrólise (GH) das proteínas foi determinado segundo a metodologia descrita por Hoyle e

Merrit (1994), sendo expresso como a porcentagem de proteínas solúveis no TCA em relação à quantidade de proteína inicial total na amostra, o cálculo foi realizado segundo a Equação 3.5.

$$\text{Grau de hidrólise \%} = \frac{(PS_t - PS_{t_0})}{P_{total}} \times 100 \quad (3.5)$$

onde,  $PS_{t_0}$  é quantidade de proteína solúvel no tempo 0 min;  $PS_t$  é quantidade de proteína solúvel no tempo  $t$ ; e  $P_{total}$  quantidade de proteína presente na amostra de siri-azul.

### 3.3.2 Caracterização da fração solúvel (hidrolisado proteico)

A fração solúvel (hidrolisado proteico) foi caracterizada segundo: o seu conteúdo de proteína bruto (método n° 991.20 – AOAC, 2005); cinzas (método n° 900.02 - AOAC, 1996); e lipídios (método n° 1443 ISO, 1973). As metodologias detalhadas estão descritas, respectivamente, no Item 3.2.2, Item 3.2.3 e Item 3.2.4, deste documento.

As amostras foram codificadas segundo os procedimentos as quais foram submetidas. SFC: amostra controle (fração solúvel, somente resíduo do processamento de siri-azul em água destilada); SFA1 e SFA3: fração solúvel do resíduo de siri-azul desproteínizado com alcalase 1% e 3% (E/S), respectivamente; SFB1 e SFB3: fração solúvel do resíduo de siri-azul desproteínizado com bromelina 1% e 3% (E/S), respectivamente.

## 3.4 TÉCNICAS CONVENCIONAIS DE RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA

Os solventes utilizados na obtenção de extratos ricos astaxantina foram escolhidos após uma vasta revisão na literatura (JEDDI; KHANIKI; SADIGHARA, 2013; MEZZOMO et al., 2011; SACHINDRA et al., 2007; SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2012). Para a escolha dos solventes orgânicos foram levados em consideração os seguintes parâmetros: (a) toxicidade; (b) eficiência na extração de astaxantina; e (c) polaridade.

A recuperação dos extratos ricos em astaxantina foi realizada com as seguintes técnicas: Soxhlet (Sox); maceração (Mac); e assistida por ultrassom (UE), e o processo de eliminação de solvente dos extratos foi

realizado em evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom, Brasil), com rotação de 40 rpm, arrefecimento de 313,15 K (MQBTZ99-20, Microquímica, Brasil) e controle de vácuo, 400 mmHg (NT 613, Nova Técnica, Brasil).

O rendimento global de extração ( $X_0$ ) foi calculado através da razão entre a massa de extrato e a massa de resíduo de siri-azul utilizada na extração, em base seca (b.s.), conforme a Equação 3.6, e o resultado expresso como média  $\pm$  desvio padrão.

$$X_0 = \frac{M_{extrato}}{M_{resíduo}} \times 100 \quad (3.6)$$

onde,  $X_0$  é o rendimento global de extração;  $M_{extrato}$  é a massa de extrato obtida; e  $M_{resíduo}$  é a massa de resíduo de siri-azul utilizada na extração em b.s.

### 3.4.1 Extração em Soxhlet (Sox)

O sistema de extração em Soxhlet é composto de um extrator, acoplado a um balão de 250 mL e a um condensador. A extração em Soxhlet (Sox) foi realizada de acordo com o método 920.39C descrito pela A.O.A.C. (2005). A amostra foi submetida à extração durante o período de 8 h, na temperatura de ebulição do solvente. A proporção utilizada foi de 5 g de amostra para 150 mL de solvente, em um aparelho extrator tipo Soxhlet de 250 mL. Por fim, foi realizada a eliminação do solvente conforme o Item 3.4, após a eliminação do solvente, os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados a 255,15 K, em *freezer* doméstico (Freezer 220, Cònsul, Brasil).

As extrações foram realizadas em duplicata, com os seguintes solventes: acetona (Sox - Ac), etanol (Sox - EtOH) e água (Sox - Ag), e as misturas de solventes: Ac:EtOH, 50:50 v/v (Sox - Ac:EtOH) e *n*-hexano:isopropanol, 50:50 v/v (Sox - Hx:IPA). Todos os solventes empregados são autorizados como solventes GRAS (*General Recognized as Safe*) e são utilizados nas indústrias de alimentos (FDA, 2017).

### 3.4.2 Extração por Maceração (Mac)

A maceração (Mac) consiste em um método de extração a frio, no qual a matéria-prima é colocada em contato com o solvente orgânico,

por um período de tempo previamente estabelecido, afim de que haja a migração dos compostos de interesse do soluto para o solvente. Para a extração, foram transferidos 6 g de amostra em 24 mL de solvente orgânico, segundo descrito por Mezzomo et al. (2011). Então, o sistema foi deixado em repouso durante 48 h a temperatura ambiente, protegido da luz e com agitação manual uma vez ao dia, seguindo a metodologia descrita por Jeddi, Khaniki e Sadighara (2013). Posteriormente, as amostras foram filtradas com papel filtro Whatman nº 40 e a eliminação do solvente foi realizada conforme descrito no Item 3.4. As extrações foram realizadas em duplicata e utilizados os seguintes solventes: Ac (Mac - Ac), EtOH (Mac - EtOH) e Ac:EtOH, 50:50 v/v (Mac - Ac:EtOH). Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados a 255,15 K, em *freezer* doméstico (Freezer 220, Cònsul, Brasil).

### 3.4.3 Extração assistida por ultrassom (UE)

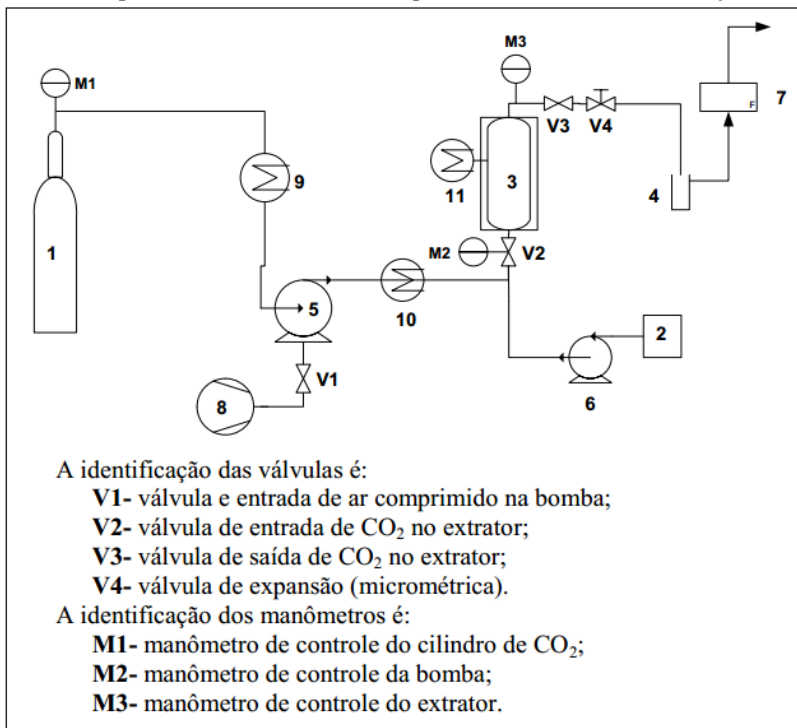
A extração assistida por ultrassom foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vinatoru (2001), onde 5 g de amostra foram transferidas para um béquer e adicionados 150 mL de solvente orgânico. Posteriormente, o béquer foi submetido a um banho indireto em ultrassom utilizando-se uma lavadora ultrassônica (Unique, Ultra Cleaner 700, Brasil), dimensões internas 10x10x5 cm, com frequência de 55 kHz, a temperatura ambiente, por 60 min. Após esse período, as amostras foram filtradas com papel filtro Whatman nº 40, separando a matriz sólida do extrato e foi realizada a eliminação do solvente conforme o Item 3.4. As extrações foram realizadas em duplicata e os solventes utilizados foram: Ac (UE - Ac), EtOH (UE - EtOH) e Ac:EtOH, 50:50 v/v (UE - Ac:EtOH). Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados a 255,15 K, em *freezer* doméstico (Freezer 220, Cònsul, Brasil).

## 3.5 RECUPERAÇÃO DE EXTRATO RICO EM ASTAXANTINA COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Na Figura 3.3 está representado o diagrama esquemático do equipamento utilizado nas extrações com fluido supercrítico. O equipamento foi desenvolvido pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha (ZETZEL; BRUNNER; MEIRELES, 2003). A

unidade de extração opera até uma pressão máxima de 30 MPa e vazões de solvente de 1,67 g/min a 36,67 g/min.

Figura 3.3 - Diagrama da unidade de extração com fluido supercrítico. Legenda: (1) Cilindro de CO<sub>2</sub>; (2) Reservatório de cossolvente; (3) Coluna de extração; (4) Frasco coletor; (5) Bomba de CO<sub>2</sub>; (6) Bomba de cossolvente; (7) Rotâmetro; (8) Compressor de ar; (9) Banho de resfriamento do CO<sub>2</sub>; (10) Banho de aquecimento; (11) Banho de aquecimento da coluna de extração.



Fonte: Mazzutti (2016).

A extração com fluido supercrítico (ESC) foi realizada utilizando como solvente CO<sub>2</sub> (≥ 99%, White Martin, Joinville, Brasil) pressurizado, em uma unidade de extração dinâmica descrita por Zetzl, Brunner e Meireles (2003) e o processo de extração foi realizado segundo a metodologia de Michielin et al. (2005), no qual 15 g de amostra foram adicionados a uma coluna encamisada de aço inox (329 mm de comprimento, 20,42 mm de diâmetro interno e capacidade de 107,74 mL), de forma que o leito de partículas estivesse fixo, seguida



pelo controle das variáveis de processo (pressão, temperatura e vazão do solvente). Ao longo do processo, o extrato proveniente da extração foi coletado em um frasco âmbar e, por fim, sua massa foi medida em uma balança analítica (AY220, Shimadzu, São Paulo, Brasil). As condições de pressão, temperatura e vazão do solvente para a extração com fluido supercrítico do resíduo de siri-azul foram definidas com base nos trabalhos de Mezzomo et al. (2010) e Félix-Valenzuela (2000). O processo de extração foi realizado durante 180 min, sendo que esse tempo foi definido através da observação da curva de extração.

Para obtenção da curva de extração global (CEG), as amostras de extrato foram coletadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico a 10 MPa, 313,15 K e a uma vazão de solvente de 13,3 g CO<sub>2</sub>/min.

Os níveis das variáveis dos ensaios de ESC subsequentes foram selecionados segundo dados previamente descritos na literatura (FELIX-VALENZUELA; HIGUERA-CIAPARAI; GOYCOOLEA-VALENCIA, 2000; MEZZOMO et al., 2013; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2012) e divididos em três grupos: (a) curvas de extração utilizando CO<sub>2</sub>, a 10 MPa e 313,15 K, variando a vazão de CO<sub>2</sub> (8,3 e 13,3 g/min); (b) ensaios para obter o rendimento global de extração ( $X_0$ ), utilizando CO<sub>2</sub> como solvente, a temperaturas de 313,15 K e 333,15 K, pressões de 10, 20 e 30 MPa e vazão constante de solvente de 13,3 g CO<sub>2</sub>/min, durante 180 min; e (c) ensaios com cossolvente, onde EtOH a 2%; 4%; e 6%; Ac a 4%; e Ac:EtOH (50:50, v/v) a 4% foram adicionados ao CO<sub>2</sub>. A escolha do solvente e a sua proporção foram estabelecidos com base nos resultados obtidos por Sánchez-Camargo et al. (2011). Os ensaios com cossolvente foram realizados a 313,15 K, 30 MPa e vazão de 13,3 g CO<sub>2</sub>/min, durante 180 min, e a separação do solvente do extrato foi realizada por evaporação a pressões reduzidas, conforme o Item 3.4.

O rendimento global de extração ( $X_0$ ) foi calculado através da razão entre a massa de extrato e a massa de resíduo de siri-azul utilizada na extração, em base seca (b.s.), conforme a Equação 3.6, descrita no Item 3.4.

As extrações foram realizadas em duplicata e o resultado de  $X_0$  expresso como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

#### 3.6.1 Determinação de carotenoides totais como astaxantina

O conteúdo de carotenoides, reportado como teor de astaxantina, foi quantificado de acordo com o método espectrofotométrico de Tolasa, Cakli e Ostermeyer (2005) modificada por Sánchez-Camargo et al. (2012). Para a quantificação, foram construídas três curvas padrão utilizando astaxantina ( $\geq 97\%$  - HPLC, Sigma Aldrich Co.) em diferentes solventes: *n*-hexano (Equação 3.7; Apêndice I), acetona (Equação 3.8; Apêndice II) e etanol (Equação 3.9, Apêndice III), e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 472, 475 e 480 nm, respectivamente para cada solvente. As análises foram realizadas em triplicata e as equações utilizadas para o cálculo de concentração de astaxantina, e o seu coeficiente de determinação, estão descritas a seguir:

$$C_{ASThex} = (8,1286 \times Abs_{472nm}) \quad r^2 = 0,94 \quad (3.7)$$

onde,  $C_{ASThex}$  é a concentração de astaxantina no extrato em  $\mu\text{g/mL}$ ; e  $Abs_{472nm}$  é o valor de absorbância medido a 472 nm.

$$C_{ASTace} = (9,1255 \times Abs_{475nm}) - 0,5013 \quad r^2 = 0,95 \quad (3.8)$$

onde,  $C_{ASTace}$  é a concentração de astaxantina no extrato em  $\mu\text{g/mL}$ ; e  $Abs_{475nm}$  é o valor de absorbância medido a 475 nm.

$$C_{ASTet} = (9,8289 \times Abs_{480nm}) - 0,3872 \quad r^2 = 0,97 \quad (3.9)$$

onde,  $C_{ASTet}$  é a concentração de astaxantina no extrato em  $\mu\text{g/mL}$ ; e  $Abs_{480nm}$  é o valor de absorbância medido a 480 nm.

As leituras de quantidade de astaxantina no extrato nanoencapsulado foram realizadas em espectrofotômetro no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia e Biotecnologia de Plantas da Universidade de Münster (Alemanha). A curva padrão foi construída utilizando astaxantina ( $\geq 97\%$  - HPLC, Sigma Aldrich Co.) em Ac:EtOH (50:50, v/v) em comprimento de onda de 477 nm (Equação 3.10; Apêndice IV):

$$C_{AST} = 6.7157 \times Abs_{477nm} \quad r^2 = 0.99 \quad (3.10)$$

onde,  $C_{AST}$  é a concentração de astaxantina no extrato em  $\mu\text{g/mL}$ ; e  $Abs_{475\text{nm}}$  é o valor de absorvância medido a 477 nm.

Para o cálculo da eficiência de encapsulamento, as nanocápsulas foram imersas em hexano. Assim, para a determinação do conteúdo de astaxantina não encapsulada, a curva padrão foi construída utilizando astaxantina HPLC padrão ( $\geq 97\%$  - HPLC, Sigma Aldrich Co.) em *n*-hexano no comprimento de onda de 472 nm (Equação 3.11; Apêndice V).

$$C_{AST} = 6.6303 \times Abs_{472\text{nm}} \quad r^2 = 0.99$$

(3.11)

onde,  $C_{AST}$  é a concentração de astaxantina no sobrenadante em  $\mu\text{g/mL}$ ; e  $Abs_{472\text{nm}}$  é o valor de absorvância medido a 472 nm.

### 3.6.2 Atividade antioxidante

As determinações da atividade antioxidante dos extratos foram realizadas no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC). A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos do resíduo de processamento de siri-azul foi avaliada por duas técnicas distintas, sendo elas: método do radical DPPH e método de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

#### 3.6.2.1 Método do radical DPPH

O método de determinação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) foi realizado segundo a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). A metodologia constitui na reação do composto em análise em uma solução etanólica de DPPH na concentração de 0,3 mM e com concentrações crescentes de 5, 10, 25, 50, 125, 250 e 500 mg/mL dos extratos, por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido o tempo de reação, faz-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (FEMTO, 800 XI, São Paulo, SP). Quanto maior a atividade antioxidante da amostra testada, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH e extrato) e diminuindo sua absorvância (MENSOR et al., 2001). Assim, com a variação de coloração é possível converter a absorvância em porcentual de atividade antioxidante (%AA), através da Equação 3.12:

$$\%AA = \left[ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (3.12)$$

onde,  $Abs_{amostra}$  é a absorbância da solução contendo a amostra após 30 min de reação;  $Abs_{branco}$  é a absorbância do soluto após 30 min de reação;  $Abs_{controle}$  é a absorbância da amostra controle após 30 min de reação.

A atividade antioxidante também foi expressa como a concentração efetiva a 50% ( $EC_{50}$ ), isto é, a concentração da solução necessária para dar uma diminuição de 50% na absorbância da solução de teste em comparação com uma solução em branco. Os ensaios DPPH foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.6.2.2 Método espectrofotométrico de descoloração do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O método espectrofotométrico de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizado segundo a metodologia descrita por Matthäus (2002) e Kang et al. (2006), na qual o sistema formado por  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico é induzido a uma rápida descoloração na ausência de um composto antioxidante. O radical livre é formado pelo ácido linoléico e por um átomo de hidrogênio, retirado de um dos grupos metila da molécula de  $\beta$ -caroteno. A taxa de descoloração da solução de  $\beta$ -caroteno é determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica inicial a 470 nm em tempos pré-determinados até 120 min. Os extratos foram dissolvidos em seus respectivos solventes, os extratos obtidos por ESC foram dissolvidos em hexano, todos na mesma concentração de 5 mg/mL. A atividade antioxidante (%AA) foi calculada pela Equação (3.13).

$$\%AA = 1 - \left\{ \frac{[Abs_{120} - Abs_0]}{[AbsC_{120} - AbsC_0]} \right\} x 100 \quad (3.13)$$

onde,  $Abs_{120}$  e  $Abs_0$  são as absorbâncias da amostra no tempo 120 e 0 min, respectivamente, e  $AbsC_{120}$  e  $AbsC_0$  são as absorbâncias do controle no tempo 120 e 0 min, respectivamente.

Em termos de comparação foi determinada a atividade antioxidante pelo método de descoloração do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido

linoleico da astaxantina comercial (AST  $\geq$  97% - HPLC, Sigma Aldrich Co.) e do antioxidante sintético de uso comercial, butil hidroxitolueno (BHT  $\geq$  99% - FCC, FG, Sigma Aldrich Co.). AST comercial e o BHT foram dissolvidos em etanol, conforme a metodologia, na mesma concentração dos extratos, de 5 mg/mL.

### 3.6.3 Perfil de ácidos graxos

A análise do perfil de ácidos graxos no extrato utilizado no nanoencapsulamento com quitosana (Sox – Ac:EtOH) no Laboratório de Análises (LABCAL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por cromatografia gasosa – CG em cromatógrafo gasoso capilar (Shimadzu, 2010, Brasil) equipado com injetor split (razão do Split 1:40).

A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada no extrato etéreo lipídico, obtido segundo a metodologia descrita no Item 3.2.4, baseada no método oficial da AOCS - Ce 1f-96 (2003). Inicialmente, 100  $\mu$ L de extrato sofreram metilação adicionando-se 0,7 mL de solução KOH 10 mol/L e 5,3 mL de metanol. Após agitação os tubos de ensaios foram incubados em banho-maria a 328,15 K por 1 h 30 min. Então, adicionou-se 580  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico 12 mol/L e os tubos foram novamente incubados em banho-maria a 328,15 K por 1 h 30 min. Por fim adicionou-se 3mL de hexano e centrifugou-se a mistura para retirar o sobrenadante.

O sobrenadante foi injetado no cromatógrafo a gás nas seguintes condições de análise: Cromatógrafo Gasoso Capilar – GC 2010 - Shimadzu. Coluna capilar: HP 88 (88% de cianopropil metilpolisiloxano) de sílica fundida, dimensões 100 m,  $\emptyset$  interno: 0,25 mm, 0,20  $\mu$ m filme. Condições de operação do cromatógrafo: split = 1:150; fluxo da coluna = 0,92 mL/min.; temperatura do detector: 533,15 K; temperatura do injetor: 423,15 K; temperatura do forno: 413,15 K – 6 min, 413,15 K – 513,15 K (277,15 K/min), 513,15 K – 6 min; gás auxiliar: nitrogênio; gás de arraste: hélio; volume injetado: 1,0  $\mu$ L. Cada sobrenadante foi injetado duas vezes no cromatógrafo.

Os resultados foram expressos em percentagem do ácido graxo, como média  $\pm$  desvio padrão.

## 3.7 RECUPERAÇÃO DE QUITINA E QUITOSANA

### 3.7.1 Recuperação de quitina

As quitinas do resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*), para obtenção de quitosana, foram recuperadas a partir dos resíduos das amostras que obtiveram os melhores resultados de despigmentação (recuperação de carotenoides) e foram obtidas após extrações com Sox, utilizando os solventes: EtOH (CSH-E) e a mistura Ac:EtOH, 50:50 v/v (CSH-AE); das extrações por maceração com EtOH (CM-E) e Ac:EtOH, 50:50 v/v (CM-AE); e com CO<sub>2</sub> supercrítico (ESC), em duas condições: com CO<sub>2</sub> (CS) a 30 MPa e 313,15 K e utilizando como cossolvente EtOH (CS-E), a 30 MPa e 313,15 K, todos com uma vazão de solvente de  $13,3 \pm 0,8$  g CO<sub>2</sub>/min.

A quitina bruta foi obtida segundo a metodologia descrita por Shahidi e Synowiecki (1991). Inicialmente, as amostras foram desmineralizadas em solução de HCl 7%, na proporção 1:10 (m/v) por 1 h em temperatura ambiente, em seguida, passaram pelo processo de lavagem com água destilada até que o resíduo da lavagem se tornasse neutro. A desproteíntização das amostras foi realizada em meio alcalino, com KOH 2%, na proporção 1:20 (m/v), a 363,15 K por 2 h, logo após, as amostras foram novamente lavadas com água destilada até que o resíduo da lavagem se tornasse neutro. Por fim, as amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar (DL-SE, DeLeo, Brasil) por 16 h a temperatura de 333,15 K. O processo de obtenção das quitinas foi realizado em duplicata.

### 3.7.2 Desacetilação da quitina

A desacetilação da quitina, para obtenção da quitosana, foi realizada segundo Kurita (2001) e Sagheer et al. (2009), 1 g de quitina bruta foi tratada com 15 mL de uma solução de NaOH 60% a 383,15 K por 2 h. Em seguida, as amostras foram lavadas em água destilada até que atingissem a neutralidade, e secas em estufa com circulação de ar (DL-SE, DeLeo, Brasil) por 16 h a 333,15 K. Por fim, as amostras foram purificadas em solução de ácido acético 2% e então, foram novamente lavadas em água destilada e secas por 16 h a 333,15 K.

### 3.7.3 Caracterização da quitosana

#### 3.7.3.1 Análise do grau de N-desacetilação

A determinação do grau de desacetilação (GD) das amostras de quitosana foi realizada no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC, utilizando um espectrofotômetro de infravermelho modelo IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Japão) equipado com detector DTGS (sulfato de triglicina deuterado), segundo as determinações do fabricante. As amostras foram preparadas com pastilhas de brometo de potássio (KBr). O cálculo do GD% foi realizado de acordo com a Equação 3.14 descrita por Sabnis e Block (1997):

$$GD\% = 97,67 - \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 26,486 \right) \quad (3.14)$$

onde,  $A_{1655}$  é a absorvância da amostra a  $1655 \text{ cm}^{-1}$ ; e  $A_{3450}$  é a absorvância da amostras a  $3450 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 3.7.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada em espectroscópio (IR Prestige-21, Shimadzu Corporation, Japão) equipado com detector DTGS (sulfato de triglicina deuterado), seguindo as determinações do fabricante e realizada por uma pessoa treinada, no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC. As amostras de quitosanas foram preparadas em *pellets* de KBr e os espectros foram registrados no modo transmitância de  $4.000$  a  $300 \text{ cm}^{-1}$ . Os espectros de cada amostra foram normalizados e a linha de base corrigida na região de interesse. Assim, a resolução melhorada (fator k de 2,0) foi aplicada por meio da auto-deconvolução de Fourier, através do *software* IR solution 1.60 (Shimadzu Corporation, 2011).

#### 3.7.3.3 Análise termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica (TG) das amostras foi realizada no Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC, utilizando um equipamento de análise térmica (STA 449F3, NETZSCH, Alemanha)

com taxa de aquecimento de 10 K/min (de 283,15 a 1273,15 K) em atmosfera de nitrogênio.

#### 3.7.3.4 Análise de difração de Raios X (DRX)

A análise de difração de raios X (DRX) foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural da UFSC em difratômetro (Kristalloflex D500, Siemens, Karlsruhe, Alemanha), segundo a determinação do fabricante e realizada por uma pessoa treinada, com radiação de cobre  $K\alpha$   $\lambda = 1.5418$  Å), filtro de níquel, potência de 40 kV e 30 mA, com uma fenda de divergência de 1°, faixa  $2\theta = 3^\circ$  até  $80^\circ$  e incremento de  $0,02^\circ$ . Para as leituras no equipamento as amostras foram moídas em partículas finas.

#### 3.7.3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi determinada utilizando microscópio eletrônico de varredura (JSM-63990LV, JEOL) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, segundo a determinação do fabricante e realizada por uma pessoa treinada. As amostras de quitosana foram recobertas com uma fina camada de ouro, sob vácuo, e as imagens foram ampliadas 100 vezes, com a voltagem de 10 kV.

#### 3.7.3.6 Massa molecular viscosimétrica média ( $\overline{M}_v$ )

As análises de massa molecular foram realizadas apenas em amostras de quitosana que foram utilizadas no nanoencapsulamento (quitosana do resíduo da amostra despigmentada por Sox - Ac:EtOH e quitosana comercial, de carapaça de camarão, massa molecular:190 – 375 kDa,  $\geq 75\%$  desacetilada; Sigma-Aldrich Co.).

A medida da viscosidade relativa das amostras em diferentes concentrações, diluídas em 0,3 M de ácido acético e 0,2 M acetato de sódio, foi realizada a 298,15 K (ângulo de inclinação  $50^\circ$ ) em um viscosímetro de esfera rolante (Anton Paar, Ostfildern, Alemanha) com ângulo de tubo ajustável, baseado no princípio do tempo da esfera rolante, ou seja, o tempo necessário para que a bola de aço role dentro de um capilar calibrado de 1,6 mm de diâmetro. A média dos resultados obtidos de quatro corridas foram expressos como massa molecular viscosimétrica média ( $\overline{M}_v$ ) usando os parâmetros de Mark-Houwink



(BRUGNEROTTO et al., 2001b; RINAUDO, 2006; RINAUDO; MILAS; DUNG, 1993).

### 3.8 NANOFORMULAÇÕES

As nanoformulações foram preparadas com o extrato do resíduo de siri-azul obtido pelo método de Soxhlet com Ac:EtOH (50:50 v/v), codificado como BC-AST, pois segundo os ensaios realizados e descritos neste documento, esse extrato apresentou melhores valores de rendimento global de extração e atividade antioxidante. Como o método de extração dos carotenoides não influenciou significativamente na estrutura das quitosanas recuperadas, optou-se por utilizar a quitosana formada após esse mesmo processo de extração.

As nanoformulações foram preparadas por emulsificação espontânea de acordo com Calvo et al. (1997) e Goycoolea et al. (2012). Inicialmente, 250 µL de solução etanólica de lecitina (Epikuron 145 V, Cargill Deutschland GmbH & Co., Hamburgo, Alemanha) 100 mg/mL foi misturada com 256 µL da solução de BC-AST (diluída em Ac:EtOH, 50:50) em três concentrações diferentes 10, 20 e 40 mg/mL (concentração final nas nanoformulações, após evaporação do solvente: 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, respectivamente). Logo após, foi acrescentado à solução 62,5 µL de Miglyol 812 N (Sasol GmbH, Witten, Alemanha) e 4,75 mL de acetona, formando a fase orgânica. Então, a fase orgânica foi imediatamente vertida em 10 mL de solução aquosa de quitosana em duas concentrações diferentes (0,25 e 0,50 mg/mL), utilizando quitosana de siri-azul (BC) e quitosana comercial (C), nas concentrações de 0,50 mg/mL (NCH) e 0,25 mg/mL (NCL). A solução foi concentrada em um rotaevaporador (Büchi R-210, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Alemanha) a 323,15 K para remoção dos solventes, com objetivo de padronizar as concentrações, todas as soluções foram evaporadas até 4,5 - 5,0 mL. As nanoemulsões (NE) foram preparadas usando o mesmo procedimento, sem incluir a quitosana. As nanocápsulas descarregadas (UN) foram preparadas substituindo a mesma quantidade de solução BC-AST por Ac:EtOH (50:50). As nanoemulsões descarregadas (UN-NE) foram preparadas sem BC-AST e quitosana. A Tabela 3.1 mostra as condições de preparação das nanoformulações de BC-AST em matriz polimérica de quitosana do resíduo de siri-azul e quitosana comercial.

Tabela 3.1 - Condições de preparo das nanoformulações dos extratos ricos em astaxantina do resíduo de processamento de siri-azul (BC-AST) em matriz polimérica de quitosana do resíduo de siri-azul (BC) e quitosana comercial (C).

Amostras <sup>1</sup>	Concentração final de BC-AST (mg/mL)	Concentração de quitosana do resíduo de siri-azul (mg/mL)	Concentração de quitosana comercial (mg/mL)
BC-NCH0.5	0,5	0,50	-
BC-NCL0.5	0,5	0,25	-
BC-NE0.5	0,5	-	-
BC-NCH1.0	1,0	0,50	-
BC-NCL1.0	1,0	0,25	-
BC-NE1.0	1,0	-	-
BC-NCH2.0	2,0	0,50	-
BC-NCL2.0	2,0	0,25	-
BC-NE2.0	2,0	-	-
C-NCH2.0	2,0	-	0,50
UN-BC-NCH	-	0,50	-
UN-BC-NCL	-	0,25	-
UN-C-NCH	-	-	0,50
UN-NE	-	-	-

<sup>1</sup>BC – nanocápsulas em matriz polimérica de quitosana do resíduo de siri-azul (com exceção das nanoemulsões - NE); C - nanocápsulas em matriz polimérica de quitosana comercial; NCH – nanocápsulas com concentração de quitosana de 0,50 mg/mL na solução inicial de preparo; NCL- nanocápsulas com concentração de quitosana de 0,25 mg/mL na solução inicial de preparo; NE – nanoemulsões; UN - nanocápsulas descarregadas, sem extrato.

### 3.8.1 Tamanho de partícula e potencial Zeta

O tamanho de partícula das nanoformulações e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS-NIBS) com ângulo de medida de 173°. O potencial Zeta foi determinado pela técnica de microeletroforese Doppler a laser e análise de fase (M3-PALS), ambos métodos descritos por Kaiser et al. (2015). Inicialmente, as soluções com os nanoformulados foram diluídas em 1:100 em água Milli-Q, então 1 mL foi adicionado a cubetas e as leituras foram realizadas no equipamento Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltda., Worcestershire, UK), equipado com laser de diodo ( $\lambda = 632,8$  nm), e medido o tamanho de partícula e o potencial Zeta. As leituras foram realizadas em triplicata para cada amostra.

### 3.8.2 Eficiência de encapsulamento (EE%)

Os espectros UV-Vis do BC-AST (comprimento de onda: 200 - 600 nm) e a eficiência de encapsulação (EE%) foram determinados através do método espectrofotométrico. Para a EE%, inicialmente foram adicionados 1 mL de hexano a 300 µL de solução de nanocápsulas, a amostra foi centrifugada durante 1 h a 16.000 rpm a 288,15 K. Uma alíquota do sobrenadante foi removida e a quantidade de astaxantina não encapsulada foi medida em espectrofotômetro de acordo com o Item 3.6.1. A EE% foi calculada de acordo com a Equação 3.15.

$$EE\% = \frac{AST_t - AST_s}{AST_t} \times 100$$

(3.15)

onde,  $AST_t$  é a quantidade total de astaxantina inicial na formulação e;  $AST_s$  é a quantidade de astaxantina no sobrenadante (astaxantina não encapsulada).

## 3.9 CITOTOXICIDADE

### 3.9.1 Cultura celular

A metodologia utilizada para o cultivo celular foi descrita por Kaiser et al. (2015). Células de rim canino (*Madin-Darby Canine Kidney, MDCK*), clone C733, foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>3</sup>, utilizando meio de cultura enriquecido com 10% soro fetal bovino fetal, 1% de L-glutanina (200 mM) e 1% penicilina-estreptomicina (10.000 unidades de penicilina, 10.000 unidades de estreptomicina em NaCl a 0,9%). As culturas foram mantidas em atmosfera úmida a 310,15 K com 5% de CO<sub>2</sub> (Sanyo MCO-19AIC, Panasonic Biomedical Sales Europe BV, AZ Etten Leur, Holanda). Após atingir a confluência microscópica, as células foram lavadas com 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS) e submetidas a 10 mL de uma solução de tripsina/EDTA (0,05% Tripsina, 0,53mM EDTA). Após o desprendimento das células, foram adicionados 10 mL de meio de cultura ao tampão de tripsina. A suspensão foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 min (Rotina 420 R, Hettich GmbH, Tuttlingen, Alemanha). O excesso de meio foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. Uma alíquota de 10 µL da suspensão de células foi diluída em 90 µL de azul de tripano e o número de células foi contado

em uma Câmara de Neubauer antes de serem inoculadas. As células foram picadas por divisão a uma razão de 1:10.

### 3.9.2 Método de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT)

A citotoxicidade das nanoformulações e do extrato BC-AST foi determinada pelo método de MTT descrito por Denizot e Lang (1986). Inicialmente, 100  $\mu\text{L}$  de células em suspensão, cultivadas segundo o Item 3.9.1, foram transferidas para cada um dos 96 poços da placa de cultura de células (aproximadamente  $10^4$  células/poço ou  $10^5$  células/mL) e foram incubadas por 24 h para que aderissem à parede da placa. Após o período de 24 h, as células foram lavadas duas vezes com em meio mínimo essencial de Eagle (*minimal cell medium*, MEM), então 100  $\mu\text{L}$  de amostras foram adicionadas e encubadas por 3 h, a temperatura de 298,15 K. As amostras foram removidas e os poços foram preenchidos com 100  $\mu\text{L}$  de MEM e 25  $\mu\text{L}$  de solução de MTT, preparada em tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 5mg/mL de brometo de tiazolil azul de tetrazólio. Após 4 h o meio foi novamente removido e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido) para a diluição do corante azul. Por fim, as placas foram colocadas em um agitador orbital a 300 rpm por 15 min e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Safire, Tecan AG, Salzburgo, Áustria) em  $\lambda = 570$  nm. Os valores de viabilidade celular foram calculados de acordo com a Equação 3.16.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{V_n}{V_{cn}} \quad (3.16)$$

onde,  $V_n$  é a viabilidade celular das células em presença dos nanoformulados; e  $V_{cn}$  é a viabilidade celular média do controle negativo.

As nanocápsulas e seus compostos foram diluídos em MEM em diferentes concentrações. Como controle positivo foi utilizado a solução de Triton-X (4% m/v) diluída em PBS e como controle negativo foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  de MEM. Cada concentração foi testada em triplicata em diferentes dias.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram estatisticamente avaliados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância com o auxílio do *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA). As diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) foram analisadas através do teste de Tukey.



## **CAPÍTULO 4: HIDROLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DE SIRI-AZUL (*CALLINECTES SAPIDUS*) PARA OBTENÇÃO DE QUITINA, PROTEÍNA E EXTRATO RICO EM ASTAXANTINA**

### **Enzymatic hydrolysis of blue crab (*Callinectes sapidus*) waste processing to obtain chitin, protein, and astaxanthin-rich extract**

#### **ABSTRACT**

Blue crab' waste is a good source of valuable substances although only few studies are related to its use, especially concerning the enzymatic hydrolysis and recovery of compounds such as astaxanthin. Besides, the reuse of crab waste may reduce environmental pollution, add value to this residue and promote a social responsibility in several small fishery communities. Therefore, this study aimed to recover protein, chitin, and astaxanthin from blue crab waste by means of enzymatic hydrolysis with alcalase and bromelain. High hydrolysis efficiency, defined by hydrolysis degree (DH), was achieved with 3% alcalase (E/S), recovering 30% of protein in 120 min reaction. The highest extraction yield ( $3.1 \pm 0.4\%$  - w/w) and astaxanthin content ( $97.7 \pm 14.3\%$   $\mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}_{\text{residue}}$ ) were from demineralized sample under acid process (DERS), before carotenoid recovery. Thermogravimetric analysis of the sample with enzymatic deproteinization presented higher thermal stability and mass loss. The enzymatic hydrolysis of the blue crab processing waste proved to be efficient to produce protein hydrolysates, mostly using 3% of alcalase enzyme related to the substrate (E/S). Additionally, it was possible to obtain chitin and astaxanthin-rich extract from the hydrolyzed residue with enzymes, like what obtained through an alkaline deproteinization process and, consequently, promote improvements in the blue crab waste environmental management.

**Keywords:** Blue crab waste. Alcalase. Astaxanthin. Chitin. Protein.

## 4.1 INTRODUCTION

Crustaceans are among the most profitable marine products. In 2012, were processed approximately 6,446,818 t of crustaceans in the world (FAO, 2014) and their industrialization generates a large amount of highly perishable waste, which most often is irregularly discarded.

The blue crab waste is basically composed by chitin, protein, minerals, fatty acids, and carotenoids, primarily astaxanthin (BATAILLE; BATAILLE, 2008; MEZZOMO et al., 2011; SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991). Chitin and carotenoids have biological activity and can be used as additives for pharmaceutical and food industries.

Therefore, the use of crustacean's wastes is an interesting research topic, concerning blue crab waste, which is very scarce in scientific literature and is one of the most important commercial seafood from the Brazilian South coast. The reuse of this residue could have a positive impact, environmentally and economically, for several small Brazilian fishery communities.

Chitosan, derived from the chitin deacetylation, has been intensively applied in different areas: agriculture (pesticides and fertilizers), water treatment (flocculants for clarification and removal of metal ions), food industry (dietary fibers, cholesterol reducers, preservatives, fungicides, bactericides, fruit coatings), cosmetic industry (skin exfoliators, acne treatments, hair moisturizers, toothpaste), and pharmaceutical industry (antitumors, hemostatics, and anticoagulants). However, its extensive application is in biomedical area (surgical sutures, dental implants, bone reconstitution, controlled release of drugs in animals and humans, materials encapsulation) (AZEVEDO et al., 2007; RINAUDO; DOMARD, 1989).

The recovery of chitin from crustacean waste usually consists of three steps: demineralization, deproteinization, and discoloration. Deproteinization is often performed with the use of chemical products and heating with temperatures above 363.15 K, which can cause degradation of some amino acids (KRISTINSSON; RASCO, 2000), and leads to waste disposal problems, because neutralization of the wastewater are necessary (GHORBEL-BELLAJ et al., 2011). Therefore, the use of commercial proteases has been proposed as an environmentally friendly method to deproteinize crustacean wastes in order to obtain protein hydrolysates of high nutritional value (CAHÚ et al., 2012; GILDBERG; STENBERG, 2001; SIMPSON et al., 1998), that can be used as a source of protein in the diet of humans and in animal



nutrition (GIGLIOTTI; JACZYNSKI; TOU, 2008; MACH; NGUYEN; NORTVEDT, 2009; SPINELLI; LEHMAN; WIEG, 1974).

After the enzymatic hydrolysis process is possible to use insoluble part to recover pigments in the form of a lipid-carotenoid extract, astaxanthin is the main carotenoid present, and solvents or supercritical CO<sub>2</sub> can be used to recover it (CAHÚ et al., 2012; HOLANDA; NETTO, 2006). Astaxanthin presents important applications in nutraceutical, cosmetic, food, and animal feed industries. The most important astaxanthin attributes are the pigmentation capacity and the antioxidant potential. The diverse biological functions of astaxanthin has attracted academic interest due to its benefits to human health (Guerin *et al.*, 2003).

Therefore, considering the environmental, economic, and process aspects discussed above, the aim of this study was to optimize chitin, protein, and astaxanthin extract recovery from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste processing through enzymatic hydrolysis processes using alcalase and bromelain enzymes.

## 4.2 MATERIALS AND METHODS

### 4.2.1 Raw material

Blue crab (*Callinectes sapidus*) waste composed essentially of crab carapaces and legs was kindly provided by small processing crab meat industries from the city of Laguna, Santa Catarina State, Brazil. The residues, collected once in November 2014, were treated based on methods described by Holanda and Netto (2006) and Mezzomo *et al.* (2011).

The blue crab waste was washed in running water and dried in air-circulated oven (DL, DeLeo, Brazil) for 8 h at 333.15 K. Then it was crushed in a blender (LiqFaz, Walitta, Brazil) and ground in a Willey grinder (Moinho Willey, DeLeo, Brazil). Small sample portions of 250 g were conditioned in plastic bags and stored at 253.15 K (domestic freezer) until the processing.

### 4.2.2 Blue crab waste characterization

The waste sample characterization was performed according to methods described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), determining: moisture and volatile content (method 926.12 – AOAC, 1996); total nitrogen (method 991.20 – AOAC, 2005); ash

(method 900.02 – AOAC, 1996). Total lipid analysis was performed according to methods described by Bligh and Dyer (1959). Raw protein content was obtained from the total nitrogen values multiplied by a conversion factor of 6.25 (A.O.A.C., 2005).

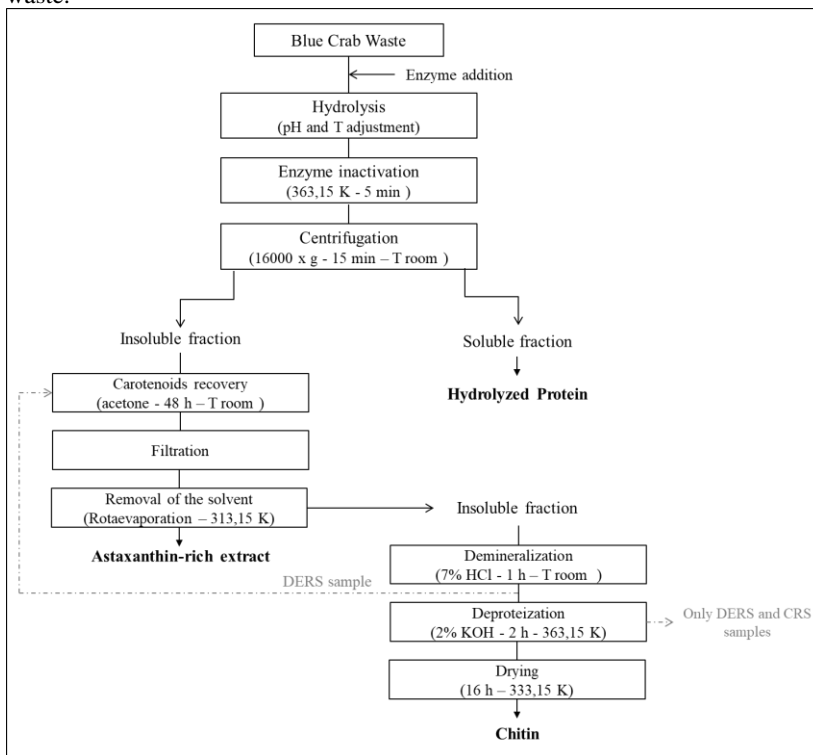
### 4.2.3 Enzymatic deproteinization

Figure 4.1 shows the process flowchart to retrieve chitin, hydrolyzed protein, and astaxanthin using enzymatic (alcalase and bromelain) and alkaline (KOH) deproteinization.

Two proteolytic enzymes were used for enzymatic deproteinization: ProteMax 750 L (alcalase), an alkaline protease of bacterial origin; and Brauzyn BCM (bromelain), an enzyme extracted from pineapple which can hydrolyze proteins into low molecular weight polypeptides (both provided by Prozyn, São Paulo, Brazil). The milled blue crab waste was blended in distilled water at a ratio of 1:4 (w/v) and hydrolysis reaction conditions used were in the proportion of 1% and 3% enzyme/substrate (E/S), and following the optimal conditions for the enzyme activity, according to the manufacturers, 326.15 K and pH of 9.0 and 6.0 for alcalase and bromelain, respectively. As the pH for blue crab waste is proximal to 9.0, it was not necessary to adjust pH for alcalase hydrolysis. However, for the bromelain reaction, the pH was adjusted to 6.0 with HCl 0.1 M. The two enzymes studied were used previously in studies of protein hydrolysis in marine products (HOLANDA; NETTO, 2006; ZHAO et al., 2009). The reactions were performed in a jacketed reactor coupled to a thermostatic bath for temperature control (MQBTZ 99-20, Microquímica, Brazil). The reaction time were defined based on the hydrolysis degree. After the reaction was complete, the hydrolyzed sample was heated to 363.15 K for 5 min for enzyme inactivation. The insoluble fraction was separated from the supernatant by centrifugation (Q222T, Quimis, Brazil) at 16,000 x g at room temperature for 15 min. The protein hydrolysate supernatant was frozen at 253.15 K and the insoluble fraction was dried in a lyophilizer (L101, LIOTOP, Brazil) for 48 h and later stored in a freezer (Freezer 280, Brastemp, Brazil) at 253.15 K until submitted to carotenoid recovery.

The samples were coded according to the procedures. CRS: control sample (raw blue crab waste); DERS: demineralized blue crab waste; HEA1 and HEA3: blue crab waste deproteinized with alcalase 1% and 3% (E/S), respectively; HEB1 and HEB3: blue crab waste deproteinized with bromelain 1% and 3% (E/S), respectively.

Figure 4.1 - Flowchart of the enzymatic hydrolysis process for blue crab (*Callinectes sapidus*) processing waste to obtain chitin, protein, and astaxanthin. CRS: control sample (raw blue crab waste); DERS: demineralized blue crab waste.



#### 4.2.3.1 Degree of hydrolysis (DH) determination

During hydrolysis reactions, 1 mL aliquots of the supernatant were added to the reaction in predetermined times of 0 (before enzyme addition), 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 and 240 min. The reaction was inactivated with 9 mL of trichloroacetic acid (TCA) 6.25%, and samples were filtered after 10 min in Whatman n° 40 filter paper in order to remove the insoluble material precipitated by TCA. Soluble proteins were determined by spectrophotometer and expressed in mg of albumin/mL according to Lowry et al. (1951) method. The degree of hydrolysis (DH) in proteins was determined based on Hoyle and Merrit (1994) method, expressed as the percentage of TCA-soluble proteins in

relation to the amount of initial total protein in the sample. Calculations were performed according to Equation (4.1):

$$DH\% = \frac{(PS_t - PS_{t_0})}{P_{total}} \times 100 \quad (4.1)$$

in which,  $PS_{t_0}$  is the amount of soluble protein at time 0;  $PS_t$  is amount of soluble protein at time  $t$ ; e  $P_{total}$  is the total amount of protein present in the blue crab sample.

#### 4.2.3.2 Soluble fraction characterization

Soluble fraction was characterized as the content of crude protein (method 991.20 – AOAC, 2005), ash (method 900.02 - AOAC, 1996), and lipids (method 1443 ISO, 1973).

Samples were coded according to the procedures. SFC: control sample (soluble fraction without enzymes, only blue crab waste in distilled water); SFA1 and SFA3: soluble fraction of blue crab waste deproteinization with alcalase 1% and 3% (E/S), respectively; SFB1 and SFB3: soluble fraction of blue crab waste deproteinization with bromelain 1% and 3% (E/S), respectively.

#### 4.2.4 Carotenoid recovery

Following the enzymatic hydrolysis, the recovery of the carotenoid fraction from deproteinized sample (insoluble lyophilized fraction) was performed according to Jeddi, Khaniki, and Sadighara (2013). In order to demonstrate that the demineralization stage may influence in the carotenoids recovery, one of the samples of raw blue crab waste has been demineralized prior to carotenoids recovery, this sample was encoded as DERS (represented in Figure 4.1). Acetone was selected as solvent in accordance to carotenoid recovery from shrimp waste by Mezzomo *et al.* (2011). All extractions were performed in duplicate.

The dried blue crab residue was used as control sample (CRS). Extractions were performed using 1:4 (w/v) of blue crab residue in acetone. The mixture remained 48 h at room temperature, protected from light. In sequence, the mixture was filtered to separate the insoluble fraction, and solvent removal was performed in a rotary evaporator with reduced pressure (550, Fisatom, Brazil).

#### 4.2.4.1 Determination of total carotenoids as astaxanthin

The astaxanthin amount in extracts was determined through spectrophotometric methods according to Tolasa, Cakli, and Ostermeyer (2005) as modified by Sánchez-Camargo et al. (2012). A standard curve was later built using standard HPLC astaxanthin ( $\geq 97\%$ -HPLC, Sigma Aldrich Co.) in acetone solvent, and absorbance was measured at the wavelength of 475 nm. Equation 4.2 was obtained from the standard curve for astaxanthin and used to calculate its concentration.

$$C_{AST} = (9.1255 \times Abs_{475nm}) - 0.5013 \quad r^2 = 0.95 \quad (4.2)$$

in which,  $C_{AST}$  is the concentration of astaxanthin in the extract expressed in  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $Abs_{475nm}$  is its absorbance value at 475 nm.

#### 4.2.4.2 Antioxidant activity

The antioxidant activity was evaluated by spectrophotometric methods of  $\beta$ -carotene bleaching as described by Matthäus (2002) and by Kang et al. (2006). Briefly, the system formed by  $\beta$ -carotene and linoleic acid induces rapid discoloration in the absence of antioxidant compound. Free radicals are formed by linoleic acid and a hydrogen atom from the methyl groups in the  $\beta$ -carotene molecule. Decoloring rate of the  $\beta$ -carotene solution is determined by the difference between the initial spectrophotometric measurement at 470 nm and measurements at predetermined times until reaching 120 min. All extracts were dissolved in acetone at concentration of 5 mg/mL. Antioxidant activity (%AA) was calculated through Equation 4.3:

$$\%AA = 1 - \left\{ \frac{[Abs_{120} - Abs_0]}{[AbsC_{120} - AbsC_0]} \right\} \times 100 \quad (4.3)$$

which,  $Abs_{120}$  and  $Abs_0$  are the absorbance values of the sample at 120 and 0 min, respectively, and  $AbsC_{120}$  and  $AbsC_0$  are the absorbance values of the control sample at 120 and 0 min, respectively. Commercial standard astaxanthin (AST  $\geq 97\%$ -HPLC, Sigma Aldrich Co.) and butylated hydroxytoluene (BHT  $\geq 99\%$ -FCC, FG, Sigma Aldrich Co.) were dissolved in ethanol in the same concentration of extracts: 5 mg/mL.

## 4.2.5 Chitin recovery

Chitin was obtained from the insoluble fraction of astaxanthin recovery as described by Shahidi and Synowiecki (1991). Initially, samples were demineralized in a 7% HCl solution, in a ratio of 1:10 (w/v), for 1 h, at room temperature. In sequence, they were washed with distilled water until the washing residue became neutral.

Samples not deproteinized by enzymatic process, coded as CRS and DERS, were deproteinized by an alkaline medium with 2% KOH solution, in a ratio of 1:20 (w/v) at 363.5 K for 2 h. In sequence, samples were washed with distilled water until the washing residue became neutral. Finally, samples were dried in an air circulation oven (DL, DeLeo, Brazil) for 16 h at 333.15 K. All extractions were performed in duplicate.

## 4.2.6 Chitin characterization

### 4.2.6.1 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analyses were performed by spectroscope (IR Prestige-21, Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a DTGS (deuterated triglycine sulfate) detector. Chitin samples were prepared with potassium bromide pellets. Spectra were recorded in transmittance values ranging from 300 to 3,000  $\text{cm}^{-1}$ . The enhanced resolution (k-factor of 2.0) was applied by means of Fourier self-deconvolution using the software IR solution 1.60 (Shimadzu Corporation, 2011).

### 4.2.6.2 Thermogravimetric analysis (TG)

Thermogravimetric analyses were performed using a thermal analysis device (STA 449F3, NETZSCH, Germany) with heating rate of 283.15 K/min (from 303.15 to 1173.15 K) in a nitrogen atmosphere.

### 4.2.6.3 Scanning Electronic Microscopy (SEM)

Morphological analyses were performed through scanning electron microscopy (TM 3030, Hitachi, Japan). Chitin samples were covered with a thin layer of gold, under vacuum, and the views were zoomed in 50 to 5,000 times, with a voltage of 10 kV.

### 4.2.7 Statistical analyses

Results were statistically evaluated through one-way analysis of variance (ANOVA) using statistical software (Statistica 7, Statsoft Inc., USA). Statistical differences ( $p < 0.05$ ) were analyzed through Tukey's test.

## 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

The chemical composition of blue crab residue is presented in Table 4.1. The moisture content present in the sample was 36%, and high levels of proteins and minerals (ash) were found,  $33 \pm 1\%$  and  $56 \pm 1\%$  respectively, which are characteristic elements of crustacean shells, while the lipid content was  $1.9 \pm 0.1\%$ . Félix-Valenzuela, Higuera-Ciapara, and Goycoolea-Valencia (2001) found similar values of protein ( $33.8 \pm 2.3\%$ ) and lower results for lipids ( $0.41 \pm 0.01\%$ ) from demineralized blue crab (*Callinectes sapidus*) waste. No results were found in the specialized literature regarding other compounds of blue crab waste.

Values found in this study were larger than those from Jo *et al.* (2008) for snow crab (*Chionoecetes opilio*), namely  $22 \pm 2\%$  of protein and  $42 \pm 1\%$  of ash. Holanda and Netto (2006) obtained values of  $39.42 \pm 0.49\%$  of protein,  $3.79 \pm 0.08\%$  of lipids, and  $31.98 \pm 1.37\%$  of ash, for shrimp waste (*Xiphopenaeus kroyeri*), with all values in dry basis (db).

Table 4.1 - Characterization of blue crab processing waste (*Callinectes sapidus*).

Components (%)	Blue crab ( <i>Callinectes sapidus</i> )
Moisture and volatile content <sup>1</sup>	$36 \pm 0$
Lipids (db) <sup>1,2</sup>	$1.9 \pm 0.1$
Raw protein (db) <sup>1,2</sup>	$33 \pm 1$
Ash (db) <sup>1,2</sup>	$56 \pm 1$

<sup>1</sup> Results are expressed in mean values from replications  $\pm$  standard deviation. <sup>2</sup> db: dry basis.

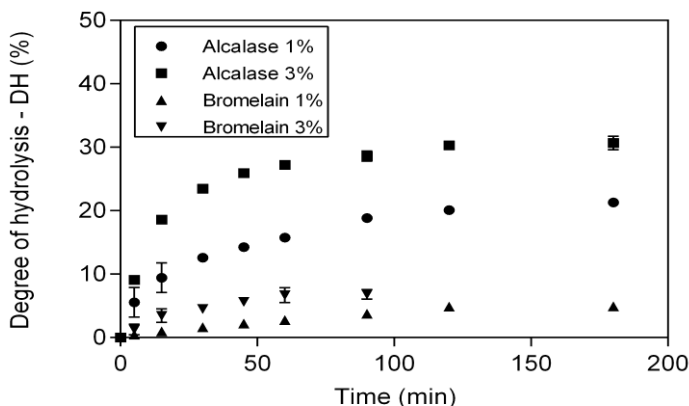
### 4.3.1 Enzymatic hydrolysis

The use of proteolytic enzymes for deproteinization of marine crustaceans waste was studied with the aim of converting the residue in

useful biomass (YOUNES et al., 2014). The alcalase enzyme was successfully applied for protein hydrolysis of marine products and by-products, forming hydrolysates with high values of essential amino acids (HIMONIDES; TAYLOR; MORRIS, 2011; HOYLE; MERRITT, 1994). Bromelain is a proteolytic enzyme found in the tissues of plant, as pineapple, and has been widely used in food, medical–pharmaceutical, cosmetic and other industries (KETNAWA; RAWDKUEN; CHAIWUT, 2010; UMESH HEBBAR; SUMANA; RAGHAVARAO, 2008). However, no data was found in the literature regarding to the use of bromelain enzyme in crustacean residues. Due to safe character, bromelain was tested in order to verify its efficiency in blue crab waste protein hydrolysis.

The kinetic curves of protein hydrolysis for blue crab waste performed using both enzymes (alcalase and bromelain) are presented in Figure 4.2. Two concentrations of enzymes were evaluated (1 and 3% of ratio E/S). The curves show a usual trend in enzyme activity, with an initial stage of high reaction rate followed by a slower rate and finally a stationary stage where practically no hydrolysis occurs. This pattern may be associated with product inhibition by compounds formed during hydrolysis, decreased concentration of peptide bonds available, and the action of soluble peptides competing for substrate with the hydrolyzed protein (HOLANDA; NETTO, 2006; REBECA; PEÑA-VERA; DÍAZ-CASTAÑEDA, 1991).

Figure 4.2 - Degree of protein hydrolysis for blue crab (*Callinectes sapidus*) waste, using alcalase 3% (■); alcalase 1% (◆); bromelain 3% (●); bromelain 1% (▲).





The use of alcalase 3% (E/S) presented the highest performance, hydrolyzing about 30% of the protein material present in the initial sample within 120 min of reaction. The same enzyme at 1% (E/S) reached 20%, also at 120 min of reaction. The increase in enzyme concentration (E/S) significantly increases enzyme activity in the substrate; however, both kinetics hydrolysis exhibit similar behavior, starting their stationary step at 120 min. For bromelain, the increase in enzyme concentration provided small increase of 2% in protein hydrolysis. In addition, the stationary phase of bromelain 3% (E/S) started at 60 min, whereas with 1% (E/S) of the same enzyme the stationary phase occurred only with 120 min of reaction. These results suggest that the alcalase enzyme has more affinity with the substrate and process conditions.

The alcalase enzyme showed higher DH (degree of hydrolysis) than values described in the specialized literature for shrimp waste (*Xiphopenaeus kroyeri*), where a DH value of about 15% with E/S of 3% (HOLANDA; NETTO, 2006), and similar values were found by Klompong *et al.* (2007), obtaining 30% of DH with alcalase at 2.5% (E/S) in yellowstripe fish meat (*Selaroides leptolepis*).

From a technological and economic perspective, enzymes from microbial sources such as alcalase show greater efficiency on protein hydrolysis of marine products when operating under alkaline pH (DUFOSSE; DE LA BROISE; GUÉRARD, 1997).

Mu, Zhao, and Li (2012) reported that the increase in DH can increase the antioxidant activity of peptides obtained from protein hydrolysis. Therefore, the high DH value from alcalase enzyme in the blue crab waste suggest the importance of studies to identify the amino acids from the raw material responsible for biological activities related to blue crab waste processing.

The approximate composition of protein hydrolysis (soluble fraction) is presented in Table 4.2. Corroborating with data from Figure 3.2, the soluble fraction of blue crab deproteinization with alcalase 3% (E/S) coded as SFA3 showed highest values of soluble protein, approximately 3.5 times higher than the soluble fraction without enzymes (SFC). SFA3 also provided the highest mineral content ( $0.83 \pm 0.03\%$ ), when compared with other samples. The hydrolyzed sample with 1% (E/S) of alcalase (SFA1) also showed significant increase of protein and mineral contents in the soluble fraction when compared with the standard sample.

The soluble fraction obtained from hydrolysis with the bromelain 1% (E/S), SFB1, did not differ statistically in protein amount ( $1.2 \pm$

0.1%) from the standard sample, although the mineral content was higher ( $0.5 \pm 0.0\%$ ). With 3% (E/S) of bromelain (SFB3) an increase in the amounts of protein and minerals was observed,  $1.5 \pm 0.0\%$  and  $0.58 \pm 0.01\%$ , respectively, when compared to the standard sample. Increasing the concentration of ratio E/S had a positive influence for hydrolysis with alcalase but it did not differ statistically from hydrolyzed samples with bromelain. The amount of lipids from hydrolysates in the soluble fraction was less than 0.5% for all samples evaluated.

Table 4.2 - Proximate composition of the protein hydrolysates in soluble fraction for blue crab (*Callinectes sapidus*) waste.

Sample <sup>1</sup>	Proteins (%) <sup>2</sup>	Lipids (%)	Ash (%) <sup>2</sup>
SFC	$1.1 \pm 0.0^a$	< 0.5	$0.2 \pm 0.0^a$
SFA1	$3.6 \pm 0.0^c$	< 0.5	$0.3 \pm 0.0^b$
SFA3	$4.1 \pm 0.1^d$	< 0.5	$0.83 \pm 0.03^f$
SFB1	$1.2 \pm 0.1^{ab}$	< 0.5	$0.5 \pm 0.0^c$
SFB3	$1.5 \pm 0.0^b$	< 0.5	$0.58 \pm 0.01^d$

<sup>1</sup>SFC – control sample (soluble fraction without enzymes, only blue crab waste in distilled water); SFA1 and SFA3 – soluble fraction of blue crab waste deproteinization with alcalase 1% and 3% (E/S), respectively; SFB1 and SFB3 – soluble fraction of blue crab waste deproteinization with bromelain 1% and 3% (E/S), respectively. Results are expressed in mean values from replications  $\pm$  standard deviation. <sup>2</sup>The same letter in the same column indicates that there was no significant difference between values ( $p < 0.05$ ).

### 4.3.2 Carotenoid recovery

Table 4.3 shows the extraction yield, the amount of astaxanthin, and antioxidant activity of extracts obtained from alkaline and enzyme deproteinization.

Table 4.3 - Extraction yield, amount of astaxanthin, and antioxidant activity from extracts of blue crab waste (*Callinectes sapidus*), obtained from alkaline and enzyme deproteinization.

Sample <sup>1</sup>	Extraction yield (w/w%, b.w.) <sup>2</sup>	Astaxanthin ( $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{residue}}$ ) <sup>2</sup>	Antioxidant activity (%)
CRS	$0.38 \pm 0.01^{\text{A,a}}$	$15.3 \pm 0.7^{\text{a}}$	$86.9 \pm 2.2^{\text{b}}$
DERS	$3.1 \pm 0.4^{\text{A}}$	$97.7 \pm 14.3^{\text{b}}$	$88.6 \pm 1.9^{\text{b}}$
HEA1	$0.38 \pm 0.08^{\text{a}}$	$12.0 \pm 2.5^{\text{a}}$	$92 \pm 2^{\text{bc}}$
HEA3	$0.62 \pm 0.03^{\text{b}}$	$20.0 \pm 1.3^{\text{a}}$	$88.6 \pm 2^{\text{b}}$
HEB1	$0.34 \pm 0.07^{\text{a}}$	$14.2 \pm 2.9^{\text{a}}$	$96.9 \pm 4.5^{\text{cd}}$
HEB3	$0.40 \pm 0.06^{\text{a}}$	$17.0 \pm 2.3^{\text{a}}$	$69 \pm 1^{\text{a}}$
AST	-	-	$74.0 \pm 0.4^{\text{a}}$
BHT	-	-	$99.4 \pm 0.6^{\text{d}}$

<sup>1</sup>CRS – control sample (raw blue crab waste); DERS – demineralized blue crab waste; HEA1 and HEA3 – blue crab waste deproteinized with alcalase 1% and 3% (E/S), respectively; HEB1 and HEB3 – blue crab waste deproteinized with bromelain 1% and 3% (E/S), respectively; AST – Commercial standard astaxanthin; BHT - butylated hydroxytoluene. Results are expressed in mean values from replications  $\pm$  standard deviation. <sup>2</sup>The same letter in the same column indicates that there was no significant difference between values ( $p < 0.05$ ).

The sample demineralized under acid process (DERS) before the carotenoid recovery obtained the highest extraction yield, at  $3.1 \pm 0.4\%$  (w/w), about 8 times more than the control sample (CRS) and with more astaxanthin than other samples at  $97.7 \pm 14.3\%$   $\mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}_{\text{residue}}$  (almost 5 times higher than HEA3 result). This indicates that the acid demineralization process before the astaxanthin recovery increased the availability of carotenoids and enables their extraction with organic solvent. Samples submitted to protein hydrolysis did not present significant differences in the extraction yield among one another and compared with the control sample, indicating that the highest yield obtained with 3% (E/S) using the enzyme alcalase is due to compounds (amino acids, minerals, etc.) being solubilized during the astaxanthin extraction process.

Holanda and Netto (2006) obtained higher values of 121  $\mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}_{\text{residue}}$  using alcalase 3% (E/S) in enzymatic hydrolyses of shrimp waste (*Xiphopenaeus kroyeri*), this value was 10% higher than their standard sample and 6 times higher that obtained in this study in the same conditions. The amount of carotenoids present in certain raw materials is due to the amount of carotenoids available in animal feed, environmental conditions, and its species (SHAHIDI; SYNOWIECKI, 1991).

Except from the HEB3 sample, the other extracts showed antioxidant activity with statistically higher values than commercial astaxanthin. Astaxanthin is found in nature conjugated with proteins or with one or two esterified fatty acids that provide stability to the molecule, as free astaxanthin is more susceptible to oxidation. Thus, astaxanthin obtained from natural sources tends to be more stable (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003).

Although the sample DERS obtained the highest carotenoid extraction values, its antioxidant activity of  $88.6 \pm 1.9\%$  did not differ significantly with values obtained for the standard sample ( $86.9 \pm 2.2\%$ ). Extracts from the samples submitted to enzymatic hydrolysis, except HEB3, show antioxidant activity statistically higher or equal the standard sample. The increase in [E/S] influenced negatively the antioxidant activity of enzymatic extracts. Carotenoid recovery from the sample hydrolyzed with bromelain 1% (E/S) presented the best values of antioxidant activity ( $96.9 \pm 4.5\%$ ) with no statistical differences with the commercial antioxidant BHT ( $99.4 \pm 0.6\%$ ).

From the data in Table 4.3 it was not possible to relate the antioxidant activity of the extracts with the amount of astaxanthin extracted, because the extraction method affects directly the type of carotenoid extracted.

Crustacean waste has large amounts of astaxanthin both esterified and free (MEZZOMO et al., 2011), with low amounts of astaxanthin combined with proteins – these are mostly found in the meat of crustaceans and salmonid fish (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). This is confirmed in this study because no significant increase in astaxanthin content and antioxidant activity was detected using protein enzymatic hydrolysis in raw blue crab waste before the recovery astaxanthin process.

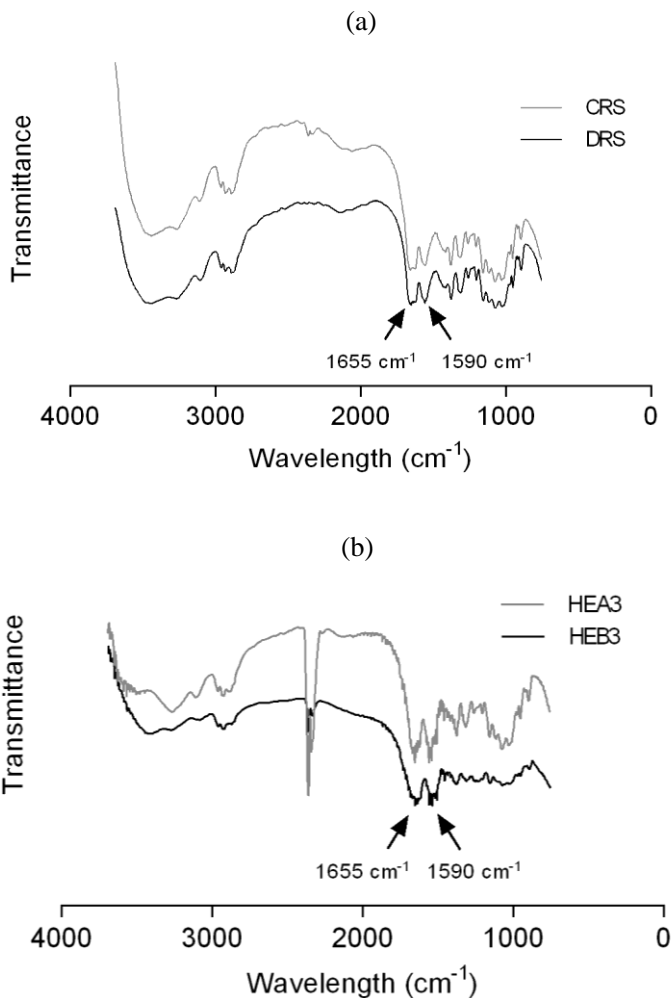
### **4.3.3 Chitin recovery**

Infrared spectroscopy can be used to characterize samples of chitin and chitosan, because both have characteristic bands of functional groups inherent to this kind of sample (BRUGNEROTTO et al., 2001a; PRABU; NATARAJAN, 2012).

The FTIR spectra presented in Figure 4.3 refer to chitin samples obtained by: alkaline deproteinization, with demineralization prior and after the astaxanthin recovery (respectively, CRS and DERS); deproteinization with alcalase at 1% and 3% (respectively, HEA1 and

HEA3); and deproteinization with bromelain at 1% and 3% (HEB1 and HEB3, respectively).

Figure 4.3 - FTIR spectra of chitin obtained from blue crab waste (*Callinectes sapidus*) through enzymatic and alkaline deproteinization. (a) CRS – alkaline deproteinization, with demineralization after astaxanthin recovery; DRS – alkaline deproteinization, with demineralization prior to astaxanthin recovery; (b) HEA3 – enzymatic deproteinization with alcalase 3% (E/S); HEB3 – enzymatic deproteinization with bromelain 3% (E/S).



Characteristics chitin bands were found for all samples and the FTIR spectra of this work present spectra similar to those described in the specialized literature (BRUGNEROTTO et al., 2001a; CAHÚ et al., 2012; CAMPANA-FILHO et al., 2007). Bands in the region between 890-1150  $\text{cm}^{-1}$  are polysaccharide bonds. Usually, samples of chitin have four feature bands between 1300-1700  $\text{cm}^{-1}$ , as found in the present study. The band at 1365  $\text{cm}^{-1}$ , called amide III, corresponds to the  $\text{CH}_2$  group and CO-NH deformation. The band at 1380  $\text{cm}^{-1}$  that is less intense in HEA and HEB is attributed to angular deformation of  $\text{CH}_3$  symmetric group. The band at 1540  $\text{cm}^{-1}$ , called amide II, represents two vibrational modes: plane N-H and stretching C-H. The band at 1610  $\text{cm}^{-1}$  is called amide I and can be attributed to axial deformation of C=O. The bump in amide I that is most clearly observed in samples CRS and DERS, indicates that the chitin extracted from the blue crab waste adopts polymorphic structure of  $\alpha$ -chitin, which is the most abundant and stable form of this compound (CAMPANA-FILHO et al., 2007; SAGHEER et al., 2009), as expected according to the literature.

Finally, the intense and wide bands identified at 3400  $\text{cm}^{-1}$  are characteristic of axial stretching vibrations of the OH group.

Due to the prevalence of  $\text{NH}_2$  groups, during the N-deacetylation of chitin the band at 1655  $\text{cm}^{-1}$  gradually decreased, while that at 1590  $\text{cm}^{-1}$  increased. The analysis of these two peaks (highlighted in Figure 3.3) can indicate efficiency of chitin production (KUMIRSKA et al., 2010).

From Figure 4.3 is possible to verify that alkaline deproteinization and the acid demineralization (CRS and DERS) provide very similar spectra, indicating that the carotenoid recovery, before or after demineralization, did not influence the chitin chemical composition. The samples CRS, DERS, HEA3 and HEB3 present similar bands at 1655  $\text{cm}^{-1}$  and 1590  $\text{cm}^{-1}$ , this suggests that enzymatic deproteinization, with 3% [E/S], was as effective as chemical deproteinization in the production of chitin from crab blue waste.

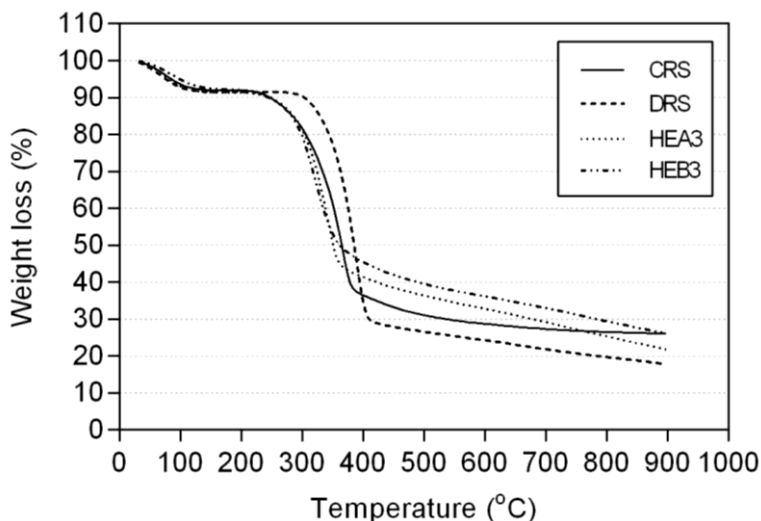
The samples HEA1 and HEB1 present the band 1590  $\text{cm}^{-1}$  lower than 1655  $\text{cm}^{-1}$ , this behavior indicates that use of 3% [E/S] is more effective than 1% [E/S] to produce chitin by enzymatic deproteinization.

Thermogravimetric analysis (TG) measures the mass changes as a function of temperature, in inert (nitrogen) or oxidative (air or similar) atmosphere. In polymeric compounds such as chitin, TG is used to assess the loss of moisture and compounds, as well as intermolecular interactions and thermal stability of analyzed materials (ZENG; LU; XU, 2013).

Figure 4.4 shows the TG curves for chitin obtained from blue crab waste through enzymatic and alkaline deproteinization. The first degradation stage, due to water loss, occurs in a similar way for all samples, between 323.15 K and 388.15 K, where all TG curves are superimposed, indicating that samples have a similar initial moisture content, and the weight loss in this stage was of approximately 5%.

The second degradation stage refers to thermal decomposition of chitin and of organic and inorganic materials present in the samples (SAGHEER et al., 2009). The DERS sample showed higher thermal stability compared to other samples, since its degradation (organic compounds) started under 559.115 K. On the other hand, degradation for other samples began under 495.15 K. The weight loss in this step for DERS sample was higher than for other samples, i.e., 59%, followed by CRS (52%), HEA3 (46%), and HEB3 (40%). The greater the weight loss in this step, the higher is the purity degree of the sample because it indicates a larger amount of chitin (ABDEL-RAHMAN et al., 2015).

Figure 4.4 - TG curves for chitin obtained from blue crab waste (*Callinectes sapidus*) through enzymatic and alkaline deproteinization. CRS – alkaline deproteinization, with demineralization after astaxanthin recovery; DERS – alkaline deproteinization, with demineralization prior to astaxanthin recovery; HEA3 – enzymatic deproteinization with alcalase 3% (E/S); HEB3 – enzymatic deproteinization with bromelain 3% (E/S).



Residual mass was observed in all samples; that is, the weight loss of samples did not reach zero, which indicates that not all chitin content was decomposed until reaching 1173.15 K. The same behavior was reported by Pereira *et al.* (2013) in chitin-chitosan polymers, and Wysokowski *et al.* (2015) in standard chitin.

In a study with chitin obtained from shrimp shells (*Litopenaeus vannamei*), Antonino (2007) obtained results similar to the present study. In the first degradation stage, relative to sample moisture, the chitin from gray shrimp lost 8.0% of mass under a peak temperature of 346.15 K. The second decomposition occurred under a peak temperature of 567.15 K, with 61.6% of weight loss.

Sagheer *et al.* (2009) obtained for chitin samples from the flower crab (*Portunus pelagicus*) the first peak under about 333.15 K, with average weight loss of 5%, and a second stage of degradation under 599.15 K with weight loss between 65% and 73%. Other authors reported similar chitin TG analyses obtained from shrimp shells from the Brazilian Atlantic coast (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2015) and from chitin-chitosan polymers (PEREIRA *et al.*, 2013).

Figure 4.5 represents a SEM of chitins obtained from blue crab waste through enzymatic processing with alcalase and bromelain, as well as with alkaline deproteinization as control sample, zoomed in 30x and 150x, respectively. SEM shows that samples with alkaline and enzymatic deproteinization have a similar structure. It is possible to observe that the morphologies present compaction and non-homogeneity with irregular particles of various shapes and sizes.

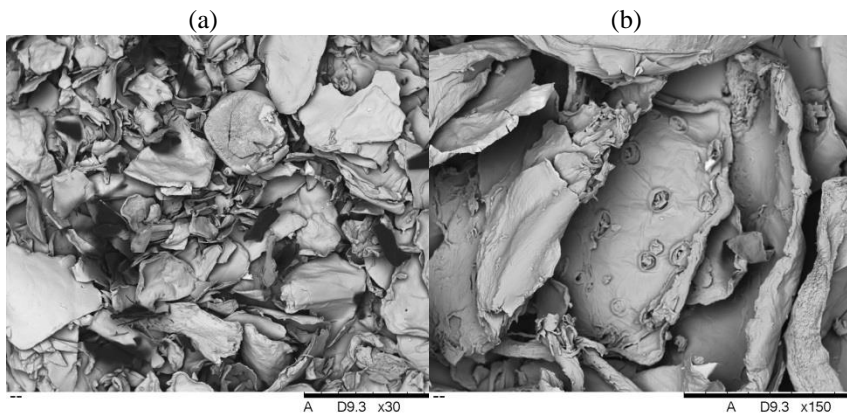
Similar morphology with non-homogeneous structure and the presence of irregular particles with various shapes and sizes was found by Wysokowski *et al.* (2014) in commercial  $\alpha$ -chitin obtained from crab shells.

Through image analysis it is possible to note that there are no significant differences in the morphology of chitin deproteinized with enzymes alcalase and bromelain, when compared to the sample deproteinized through traditional methods with an alkaline reagent. The SEM results presented in Figure 4.5 show that the deproteinization process (neither using enzymes nor alkaline reagents) has no influence in size, shape, or porosity.

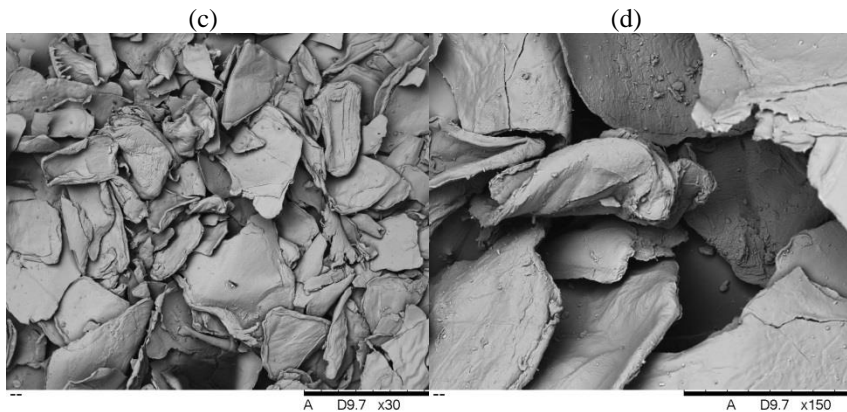


Figure 4.5 - Scanning electronic microscopy of chitin obtained from blue crab waste (*Callinectes sapidus*). CRS – alkaline deproteinization at zoom: (a) 30x and (b) 150x; HEA3 – enzymatic deproteinization with alcalase 3% (E/S) at zoom: (c) 30x and (d) 150x; HEB3 – enzymatic deproteinization with bromelain 3% (E/S) at zoom: (e) 30x and (f) 150x.

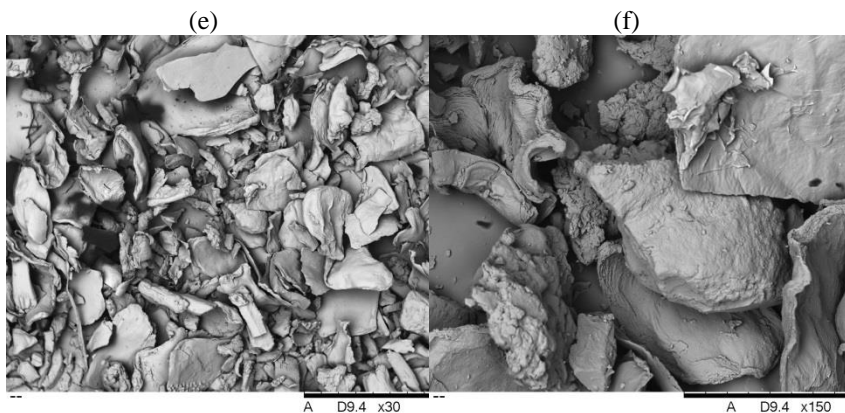
## CRS



## HEA3



## HEB3



#### 4.4 CONCLUSIONS

This study revealed the practical relevance of blue crab waste processing as a proper source of proteins, chitin, and carotenoids. Protein hydrolysis using the enzyme alcalase at 3% [E/S] obtained the best degree of hydrolysis, resulting in approximately 30% of protein material after 120 min of reaction, as well as similar composition of blue crab deproteinization in soluble fraction. Alcalase 3% also yielded high values of soluble protein, approximately 3.5 times higher than the soluble fraction without the presence of enzymes. The enzyme bromelain had low DH efficiency in for the studied concentrations of 1% and 3% (E/S).

Extracts obtained from insoluble fraction of the enzymatic hydrolysis in this study indicate that blue crab waste presents a proper source of astaxanthin. Its antioxidant activity can be compared to that of positive controls such as standard astaxanthin and BHT, particularly in the case of the extract hydrolyzed using bromelain 1% (E/S), which indicates that they can be used in other systems as natural antioxidants.

The FTIR, TG and SEM analyses of chitins obtained from enzymatic hydrolysis showed characteristics similar to those reported in the traditional literature. It was also possible to assess that the enzymatic treatment to obtained hydrolyzed protein does not change the structure of chitin drastically. It is possible to conclude that the enzymatic hydrolysis, a deproteinization environmentally friendly method of blue crab waste (*Callinectes sapidus*) processing can be used to produce

protein concentrated, chitin and astaxanthin-rich extract, and the use of crustacean waste, associate to enzymatic deproteinization is a promising clean technology for the disposal and management of the crustacean waste.



## CAPÍTULO 5: RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA NA QUITOSANA DE RESÍDUO DE SIRI-AZUL (*Callinectes sapidus*)

### Recovery of astaxanthin and evaluation of astaxanthin extraction methods influence on chitosan from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste

#### ABSTRACT

A small portion of live blue crab (*Callinectes sapidus*) is used for human consumption, and the remainder is a highly perishable residue which is often discarded directly into the sea without proper treatment. This residue represents an interesting source of bioactive molecules. Thus, this study proposed to evaluate the efficiency of astaxanthin recovery from the blue crab processing waste by different extraction methods, under high pressure, using a sustainable method of supercritical extraction with CO<sub>2</sub>, and using low pressure methods of extraction (LPE), such as Soxhlet (Sox), maceration (Mac), and ultrasound assisted (UE). After astaxanthin recovery, chitosan was recovered from the depigmented residue and the influence of depigmentation method on chitosan extraction from blue crab waste was evaluated. The extracts obtained through LPE showed the best results for the global extraction yield ( $X_0$ ), astaxanthin recovery, and antioxidant activity when compared to SFE results. The best extraction yield was  $13.8 \pm 0.7\%$  for Sox with water and Sox with ethanol retrieving the highest amount of astaxanthin  $47.1 \pm 0.6 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ , but extractions with acetone were more effective in extracting astaxanthin with biological activity. SFE extraction technique using 4% of acetone as co-solvent proved to be very efficient in obtaining a highly pure extract able to prevent the formation of free radicals. Chitosan recovery from depigmented residues were compared to a commercial sample and showed similarity among them in the evaluated parameters. This means that the astaxanthin recovery method, even through SFE, does not cause major structural changes in depigmented blue crab waste.

**Keywords:** Blue crab waste. Astaxanthin. Depigmented waste. Chitosan.

## 5.1 INTRODUCTION

Crustaceans are an important marine source of food. In 2012, 6,446,818 t of crustaceans were produced worldwide, corresponding to 9.7% of total fish production, and an economic value corresponding to 22.4% (US\$ 30.9 billion) of the total (FAO, 2016). Blue crab (*Callinectes sapidus*) is a crustacean of the order Decapoda and his capture is an important source of income for small-scale producers in Brazil, but waste disposal is often done incorrectly, resulting in increased local pollution. During blue crab processing, around 28% of live crab results in food for human consumption, and the remainder is residue. (SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2005). These residues contain valuable nutrients and bioactive compounds such as peptides (proteins), mineral salts, chitin, essential fatty acids, and carotenoid pigments, mainly astaxanthin – AST (HIGUERA-CIAPARA; FÉLIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006).

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ - $\beta$ -carotene-4,4'-dione) is a xanthophyll pigment of formula  $C_{40}H_{52}O_4$  and the main component responsible for pink-orange coloration in some crustaceans and fish. AST has important industrial application. The global market for synthetic and natural astaxanthin in feed for aquaculture, nutraceuticals, cosmetics, and food and beverages was estimated at 280 metric tons, valued at US\$ 447 million in 2014, and is projected to reach 670 metric tons valued at US\$ 1.1 billion by 2020 (RESEARCH AND MARKETS, 2015). Currently the trade in astaxanthin is based on its synthetic form with applications in aquaculture. Synthetic astaxanthin is produced from petrochemical sources, which raises the issues of food safety, pollution and sustainability. Synthetic astaxanthin can only be used in the pigmentation of fish feed and its use has not been approved in food and human supplementation (LI et al., 2011; PANIS; CARREON, 2016). Therefore, the use of blue crab waste for AST recovery can minimize environmental pollution, replace synthetic AST, and improve the economy of fishing industries and local small-scale producers.

The various biological functions of astaxanthin have attracted interest due to benefits to human health (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). Many studies have shown that AST is a powerful antioxidant (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017; MEZZOMO et al., 2011; ZHAO et al., 2016), cardioprotective agent (GROSS; LOCKWOOD, 2004), protects the skin against UV-induced photo-oxidation (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003; PAPAS, 1998), has neuroprotective effect (MASOUDI et al., 2017), antitumor

properties (JYONOUCHI et al., 2000; ONOGI et al., 1998) and kidney protective properties against alcohol effects (ALESCI et al., 2015).

Extraction efficiency of AST depends on the solvent and technique used. AST extraction from crustaceans is normally done with organic solvents such as ethanol, acetone, *n*-hexane, isopropanol (JEDDI; KHANIKI; SADIGHARA, 2013; MEZZOMO et al., 2011). Techniques using organic solvents have low cost and are easily applicable, but after extraction it is essential to retrieve the solvent due to environmental and economic problems. AST extraction can also be performed by acid, alkaline and enzymatic treatments, vegetable and animal oils, and supercritical fluids extraction (SFE) or by combining techniques (JEDDI; KHANIKI; SADIGHARA, 2013; SACHINDRA; MAHENDRAKAR, 2005, 2011; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2011)

The extraction with supercritical fluids is based on the use of solvents near to their critical point. The SFE allows for continuous adjustment of solvation power and consequently for solvent selectivity, not using organic solvents that pollute and not needing evaporation to remove the solvent. For these last two reasons, this technique is considered green and environmentally friendly (HERRERO et al., 2010). The most widely used supercritical fluid is carbon dioxide (critical properties: 304.25 K and 7.39 MPa) which is inexpensive, ecological, safe, and has high diffusivity (BRUNNER, 1994).

Chitosan is the most commonly used chitin derivative in the industry, obtained through the structural change of chitin through alkaline hydrolysis. Chitosan is a biodegradable and biocompatible polymer with applications in different areas such as agriculture, water treatment, food industry, and biopharmaceutics. However, its major application is in the biomedical area (surgical sutures, dental implants, bone reconstitution, contact lenses, controlled release of drugs in animals and humans, and in materials encapsulation) (AZEVEDO et al., 2007; RINAUDO; DOMARD, 1989). Chitosan also has several important industrial applications. In 2015, the global chitosan market was valued at US\$ 1.52 billion and is forecast to experience gains over 16% CAGR between 2016 and 2024 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2016). Chitin extraction follows three basic steps: a) depigmentation (basically carotenoids extraction); b) demineralization; and c) deproteinization. There are no reports in the researched literature evaluating the influence of depigmentation methods on the obtained chitin, usually used for chitosan production.

Therefore, due to the scarce literature about the extraction of bioactive compounds from blue crab waste and its significant worldwide

capture, especially in Brazil, the purpose of this study was: (a) to evaluate the efficiency of different solvents and methods using conventional techniques and SFE with CO<sub>2</sub> to obtain astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) processing waste; and (b) recovery chitin from the depigmented residue, convert it into chitosan, and evaluate the influence of the astaxanthin extraction method on the chitosan.

## 5.2 MATERIALS AND METHODS

### 5.2.1 Raw material

Blue crab (*Callinectes sapidus*) residue, composed by carapace and legs was collected in the period of November 2014 in the city of Laguna (Santa Catarina, Brazil). Raw material preparation was carried out according to Holland and Netto (2006) and Mezzomo et al. (2011). The raw material was washed in running water and dried in air circulation oven (DL-SE, DeLeo, Brazil) for 8 hours at 333.15 K. After dried, samples with a predetermined mass (100 g) were ground in a domestic blender (LiqFaz, Wallita, Brazil) for a specific amount of time (15 s). Portions of 250 g each were stored in polyethylene plastic bags proper to package food, and stored at 253.15 K until analysis.

The determination of moisture and volatile substances was performed according to method 925.09 of AOAC (2005). This method is based on the loss of moisture and volatile substances from a sample with a predetermined mass, oven-dried at 378.15 K. The procedure was performed in triplicate and the result expressed as a percentage ( $w/w_{\text{waste}} \pm$  standard deviation).

### 5.2.2 Low pressure extractions (LPE)

Solvents used for astaxanthin-rich extract recovery were defined according to specialized literature (JEDDI; KHANIKI; SADIGHARA, 2013; MEZZOMO et al., 2011; SACHINDRA et al., 2007; SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2012) by considering: (a) toxicity; (b) astaxanthin solubilization; and (c) polarity.

Extraction methods conducted at atmospheric pressure and the respectively solvents used were: (a) Soxhlet (Sox) with acetone (Sox - Ac), ethanol (Sox - EtOH), water (Sox - Wtr), and the mixtures Ac:EtOH, 50:50 v/v (Sox - Ac:EtOH) and hexane:isopropanol, 50:50



v/v (Sox – Hx:IPA); (b) maceration (Mac) with acetone (Mac - Ac), ethanol (Mac - EtOH) and acetone:ethanol, 50:50 v/v (Mac - Ac:EtOH); (c) ultrasound assisted (UE) with acetone (UE - Ac), ethanol (UE - EtOH) and acetone:ethanol, 50:50 v/v (UE - Ac:EtOH). Solvent removal process of the obtained extracts was performed in a rotary evaporator (Mod. 550 and 802, Fisatom, Brazil) with cooling (MQBTZ99-20, Microquímica, Brazil) and vacuum control (NT 613, Nova Técnica, Brazil). The global yield ( $X_0$ ) was calculated by the ratio between the extracted mass and the raw material mass used for extraction, on dry basis (d.b.), according to Equation 5.1:

$$X_0 = \frac{M_{extract}}{M_{raw\ material}} \times 100 \quad (5.1)$$

where,  $X_0$  is global yield,  $M_{extract}$  is the extracted mass obtained,  $M_{raw\ material}$  is the raw material mass used in extraction on d.b.

#### 5.2.2.1 Soxhlet (Sox)

Extraction with Soxhlet (Sox) was performed according to method 920.39C described by A.O.A.C. (2005). The sample was submitted to the extraction during the period of 8 h at the solvent boiling temperature. The proportion used was 5 g of sample to 150 mL of solvent in a 250 mL Soxhlet extractor. Finally, solvent elimination was performed according to item 5.2.2. The extractions were performed in duplicate and the result expressed as mean value  $\pm$  standard deviation.

#### 5.2.2.2 Maceration (Mac)

Maceration (Mac) extraction was performed according to method described by Mezzomo et al. (2011), 6 g of sample was transferred into 24 mL of organic solvent and the system was allowed to stand for 48 h at room temperature, protected from light and with manual shaking once a day, following the methodology described by Jeddi, Khaniki and Sadighara (2013). Subsequently, the samples were filtered with Whatman n° 40 filter paper and the concentration of the extracts was performed as described in item 5.2.2. The extractions were performed in duplicate and the result expressed as mean value  $\pm$  standard deviation.

### 5.2.2.3 Ultrasound assisted (UE)

Ultrasound assisted extraction was performed according to Vinatoru (2001), 5 g of sample was transferred into 150 mL of organic solvent. Subsequently, the beaker with the solution was subjected to an indirect ultrasonic cleaner bath (Unique Ultracleaner, USC-700), in a frequency of 55 kHz and room temperature for 60 min. After, the samples were filtered with Whatman n° 40 filter paper and the solvent was eliminated according item 5.2.2. The extractions were performed in duplicate and the result expressed as mean value  $\pm$  standard deviation.

### 5.2.3 Supercritical fluid extraction (SFE)

Supercritical fluid extraction (SFE) was performed using pressurized carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) ( $\geq 99\%$ , White Martins, Joinville, Brazil) in a dynamic extraction unit described by Zetzl, Brunner and Meireles (2003) and the extraction process was performed according to Michielin et al. (2005) in which 15 g of sample were added to a jacketed stainless steel column (329 mm long, 20.42 mm internal diameter and 107.74 mL capacity), so that the particle bed was fixed, followed by the control of the process variables (pressure, temperature and solvent flow). Throughout the process, the extract was collected in an amber flask and its mass was measured on analytical balance (AY220, Shimadzu, São Paulo, Brazil). The pressure, temperature and solvent flow conditions for the supercritical fluid extraction of the blue crab waste were defined based on the study of Mezzomo et al. (2010) and Félix-Valenzuela (2000). The extraction process was performed during 180 min, this time was defined through the observation of the extraction curve.

The subsequent SFE tests were divided into three groups: (a) extraction curves using  $\text{CO}_2$  at 10 MPa and 313.3 K with different flow rate of  $\text{CO}_2$  (8.3 and 13.3  $\text{gCO}_2/\text{min}$ ) up to constant mass; (b) tests to obtain the global extraction yield using  $\text{CO}_2$  as solvent at temperatures of 313.15 and 333.15 K, pressures of 10, 20 and 30 MPa and constant solvent flow of 13.3  $\text{gCO}_2/\text{min}$ , for 180 min; and (c) co-solvent assays, where organic solvents were added to the  $\text{CO}_2$ , EtOH at concentrations of 2%, 4%, and 6% (w/w), Ac at 4% (w/w) and Ac:EtOH at 4% (w/w) the choice of solvents and its proportion were established based on the results obtained by Sánchez-Camargo et al. (2011) and evaluation of the LPE results. The co-solvent tests were performed at 313.15 K, 30 MPa

and 13.3 gCO<sub>2</sub>/min for 180 min, and the solvent separation was performed by evaporation at reduced pressures, according to item 5.2.2.

### 5.2.4 Total carotenoids as astaxanthin

Carotenoid content reported as astaxanthin, was quantified according to Tolasa, Cakli and Ostermeyer (2005) using a spectrophotometric method modified by Sánchez-Camargo et al. (2012). To the quantification were prepared three standard curves using astaxanthin HPLC ( $\geq 97\%$  - HPLC, Sigma Aldrich Co.) in different solvents: *n*-hexane (Equation 5.2), acetone (Equation 5.3) and ethanol (Equation 5.4), and the absorbance was measured at wavelength of 472, 475 and 480 nm, respectively for each solvent. The analyzes were carried out in triplicate and the equations used to calculate astaxanthin concentration, and their determination coefficient, are described below:

$$C_{ASThex} = (8.1286 \times Abs_{472nm}) \quad r^2 = 0.94 \quad (5.2)$$

where,  $C_{ASThex}$  is astaxanthin amount in extract in  $\mu\text{g/mL}$  and  $Abs_{472nm}$  is the absorbance at 472 nm.

$$C_{ASTace} = (9.1255 \times Abs_{475nm}) - 0.5013 \quad r^2 = 0.95 \quad (5.3)$$

where,  $C_{ASTace}$  is astaxanthin amount in extract in  $\mu\text{g/mL}$  and  $Abs_{475nm}$  is the absorbance at 475 nm.

$$C_{ASTet} = (9.8289 \times Abs_{480nm}) - 0.3872 \quad r^2 = 0.97 \quad (5.4)$$

where,  $C_{ASTet}$  is astaxanthin amount in extract in  $\mu\text{g/mL}$  and  $Abs_{480nm}$  is the absorbance at 480 nm.

### 5.2.5 Antioxidant activity

#### 5.2.5.1 Free radical scavenging activity (DPPH)

The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) radical scavenger method (MENSOR et al., 2001) evaluated the free radical scavenging activity of the blue crab waste extracts. Briefly, the blue crab extracts were mixed with a 0.3 mM of DPPH ethanol solution to give final concentrations of 5, 10, 50, 125, 250 and 500 mg/mL of DPPH solution.

After 30 min at room temperature, the absorbance values were measured at 517 nm in a spectrophotometer (FEMTO, 800 XI, São Paulo, SP) and converted into percentage of antioxidant activity (%AA). This activity was also expressed as the effective concentration at 50% ( $EC_{50}$ ), i.e., the concentration of the solution required to give a 50% decrease in the absorbance of the test solution compared to a blank solution. The DPPH assays were performed in triplicate and the value presented is the mean values.

#### 5.2.5.2 $\beta$ -carotene bleaching method

Antioxidant activity performed by the spectrophotometric method of  $\beta$ -carotene/linoleic acid discoloration system was described by Matthäus (2002) and Kang et al. (2006). The discoloration rate of the  $\beta$ -carotene solution is determined by measuring the difference of the initial spectrophotometric reading at 470 nm at pre-determined times up to 120 min. The extracts were dissolved in the organic solvent used in the extraction, all in the same concentration of 5 mg/mL. Commercial astaxanthin (AST  $\geq$  97% HPLC, Sigma Aldrich Co.) and butylhydroxytoluene (BHT  $\geq$  99% FCC, FG, Sigma Aldrich Co.) were dissolved in ethanol, according to the methodology, at the same concentration of the extracts, 5 mg/mL.

#### 5.2.6 Chitin Recovery

Chitin was recovery from depigmented residues obtained by Sox extraction with the solvents: EtOH (CSH-E); and the mixture Ac:EtOH, 50:50 v/v (CSH-AE); Mac extraction with EtOH (CM-E) and Ac:EtOH (CM-AE); and with supercritical fluid under two conditions: at 30MPa and 313.15 K with pure CO<sub>2</sub> (CS); and using EtOH as co-solvent (CS-E), at 30 MPa and 313.15 K. Crude chitin was obtained according to Shahidi and Synowiecki (1991). Samples were demineralized in 7% HCl solution at a ratio of 1:10 (w/v) for 1 h at room temperature, then passed through the washing process with distilled water until the wash residue becomes neutral. Deproteinization of the samples was carried out in alkaline medium with 2% KOH in a ratio of 1:20 (w/v) at 363.15 K for 2 h, after the samples were again washed with distilled water until the residue becomes neutral. Finally, the samples were submitted to air drying (DL-SE, DeLeo, Brazil) for 16 h at 333.15 K. The process of obtaining the chitins was performed in duplicate.

### 5.2.7 *N*-Acetylation of chitin

The chitin deacetylation to obtain chitosan was performed in duplicate according to Kurita (2001) and Sagheer et al. (2009). Briefly, 1 g of crude chitin was treated with 15 mL of 60% NaOH solution at 383.15 K. Then, the samples were washed in distilled water until becomes neutral and air dried (DL-SE, DeLeo, Brazil) for 16 h at 333.15 K. Finally, the samples were purified in 2% acetic acid solution and then washed again in distilled water and dried for 16 h at 333.15 K.

### 5.2.8 Chitosan characterization

#### 5.2.8.1 *N*- deacetylation degree (DD)

Chitosan samples DD determination were carried out using an infrared spectrophotometer model IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with detector DTGS (deuterated triglycine sulfate). Samples were prepared with potassium bromide (KBr) tablets. The DD calculation was performed according to the Equation 5.5 described by Sabnis and Block (1997):

$$DD\% = 97.67 - \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 26.486 \right) \quad (5.5)$$

where,  $A_{1655}$  is sample absorbance at  $1655 \text{ cm}^{-1}$ ; e  $A_{3450}$  is sample absorbance at  $3450 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 5.2.8.2 Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analyses were performed by spectroscope (IR Prestige-21, Shimadzu Corporation, Japan) equipped with a DTGS (deuterated triglycine sulfate) detector. Chitosan samples were prepared with KBr pellets. Spectra were recorded in transmittance values ranging from  $300$  to  $4,000 \text{ cm}^{-1}$ . The enhanced resolution ( $k$ -factor of 2.0) was applied by means of Fourier self-deconvolution using the software IR solution 1.60 (Shimadzu Corporation, 2011).

### 5.2.8.3 Thermogravimetric analysis (TG)

The thermogravimetric curve was obtained with a balance thermogravimetric - SDT 2960 of TA Instruments (Delaware, USA) with a heating rate of 10 K/min (temperature ramp 293.15 to 873.15 K) in nitrogen atmosphere for temperature analysis of degradation.

### 5.2.8.4 X-ray diffraction (XRD)

Chitosan samples XRD analyzes were performed on a diffractometer (Kristalloflex D500, Siemens, Karlsruhe, Germany). Were used a copper  $K\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ), nickel filter, potency of 40 kV and 30 mA, with a  $1^\circ$  divergence slit. The samples were analyzed in powder, using a reading step of  $0.02^\circ$ , step time of 2 s and in the  $2\theta$  range of 3 to  $80^\circ$ .

### 5.2.8.5 Scanning Electronic Microscopy (SEM)

Morphological analyses were performed through scanning electron microscopy (TM 3030, Hitachi, Japan). Chitosan samples were covered with a thin layer of gold, under vacuum, and the views were zoomed in 100 times, with a voltage of 10 kV.

## 5.2.9 Statistical Analysis

The results were statistically evaluated through one-way analysis of variance (ANOVA) using statistical software Statistica for Windows 7 (Statsoft Inc., USA). Statistical significant differences ( $p < 0.05$ ) were analyzed using the Tukey test.

## 5.3 RESULTS AND DISCUSSION

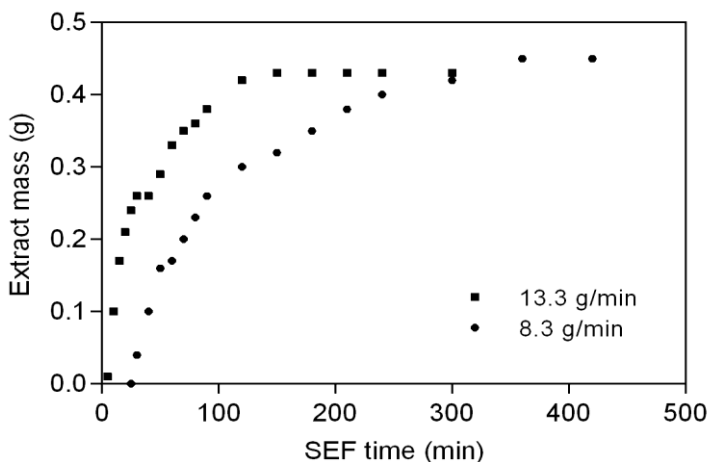
### 5.3.1 SFE with pure $\text{CO}_2$

The overall extraction curves (EC) obtained by SFE at 10 MPa, 313.5 K, and different flow rates (8.3  $\text{gCO}_2/\text{min}$  and 13.3  $\text{gCO}_2/\text{min}$ ) are shown in Figure 5.1. The EC indicates different extraction stages. In the first stage, the extraction occurs at a constant rate because the particles are surrounded by a superficial layer of solute, causing the process to be characterized by the mass transfer with convection between the surface of the solid mass and the solvent. Later, due to the exhaustion of this

solute layer on the surface of the particles, a stage with decreasing extraction speed occurs. Thereafter, compounds from within the particles begin to be extracted and the diffusion mechanism begins to control mass transfer. Finally, the extraction velocity becomes nearly null, the curve slope decreases, and it approaches the value that represents the theoretical content of extractable solute (the diffusional stage).

Comparing the curves in Figure 5.1, it can be noted that the change in solvent flow rate did not significantly influence the extracted mass of approximately 0.45 g for both flow rates, but it considerably changes the time the curves take to reach their diffusional stages. With an increase in solvent flow rate from 8.3 gCO<sub>2</sub>/min to 13.3 gCO<sub>2</sub>/min, the extraction time decreases from 360 min to 180 min. This represents a reduction of CO<sub>2</sub> use of almost 20%, consumption ranges from 2988.0 gCO<sub>2</sub> to 2394.0 gCO<sub>2</sub> per extraction. According to Marrone et al. (1998), the availability flow rate of the solvent increases the concentration gradient between the solid and the solvent and the mass transfer rates, due to the increase in the convection mechanisms.

Figure 5.1 – Overall extraction curve of blue crab (*Callinectes sapidus*) waste extract obtained by SFE with pure CO<sub>2</sub>, at 10 MPa, 313.15 K, and flow rates of (■) 8.3 gCO<sub>2</sub>/min e (●) 13.3 gCO<sub>2</sub>/min.



According to the EC, the solvent flow rate of 13.3 gCO<sub>2</sub>/min was more efficient in SFE extraction and was selected for the subsequent

evaluations of operational parameters (temperature, pressure, and co-solvent application).

### 5.3.2 Global yield ( $X_0$ ) of SFE and LPE

Parjikolaei et al. (2015) observed greater effectiveness in the extraction of astaxanthin in wet shrimp waste in comparison with dry waste. Certain degree of humidity in the raw material may aid the solute extraction because the water inside the solid matrix makes the material porous enabling the solvent entry and solubilize the solute. Moisture value found for blue crab waste was  $22.1 \pm 0.2\%$ . Mezzomo et al. (2013) obtained higher SFE efficiency from shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue, with  $11.210 \pm 0.005\%$ , compared to  $46.30 \pm 0.06\%$ , of moisture content in raw material.

Global extraction yield ( $X_0$ ) is the total amount of compound present in the solid matrix which can be extracted by the solvent, under conditions of established extractions (SILVA, 2004). The extraction yields, as well as the polarity of solvents for blue crab waste recovery obtained through LPE and SFE techniques, are shown in Table 5.1.



Table 5.1 – Global extraction yield ( $X_0$ ) of blue crab waste extracts (*Callinectes sapidus*) through low pressure extractions (LPE) and supercritical fluid extraction (SFE).

Extraction methods <sup>1</sup>	Solvent <sup>2</sup>	Solvent polarity index <sup>3</sup>	CO <sub>2</sub> density (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>4</sup>	X <sub>0</sub> (% d.b.) <sup>5</sup>
Soxhlet	Hx:IPA	1.95	-	2.3 ± 0.2 <sup>de</sup>
	Ac	5.10	-	2.3 ± 0.1 <sup>de</sup>
	Ac:EtOH	5.15	-	4.7 ± 0.2 <sup>b</sup>
	EtOH	5.20	-	5.6 ± 0.3 <sup>b</sup>
	Wtr	9.00	-	13.8 ± 0.7 <sup>a</sup>
Maceration	Ac	5.10	-	1.7 ± 0.1 <sup>e</sup>
	Ac:EtOH	5.15	-	3.6 ± 0.5 <sup>c</sup>
	EtOH	5.20	-	3.28 ± 0.01 <sup>cd</sup>
Ultrasound	Ac	5.10	-	1.4 ± 0.1 <sup>e</sup>
	Ac:EtOH	5.15	-	2.9 ± 0.1 <sup>cd</sup>
	EtOH	5.20	-	3.0 ± 0.1 <sup>cd</sup>
	CO <sub>2</sub>	-	0.290	0.019 ± 0.005 <sup>C</sup>
SFE 333.15 K/10MPa	CO <sub>2</sub>	-	0.629	0.29 ± 0.01 <sup>BC</sup>
SFE 313.15 K/10MPa	CO <sub>2</sub>	-	0.725	0.37 ± 0.02 <sup>BC</sup>
SFE 333.15 K/20MPa	CO <sub>2</sub>	-	0.830	0.354 ± 0.001 <sup>BC</sup>
SFE 313.15 K/20MPa	CO <sub>2</sub>	-	0.840	0.19 ± 0.02 <sup>C</sup>
SFE 313.15 K/30MPa	CO <sub>2</sub>	-	0.910	0.32 ± 0.01 <sup>BC</sup>
SFE 313.15 K/30MPa	CO <sub>2</sub> + 2% EtOH	-	-	1.08 ± 0.02 <sup>AB</sup>
SFE 313.15 K/30MPa	CO <sub>2</sub> + 4% EtOH	-	-	1.5 ± 0.1 <sup>A</sup>
SFE 313.15 K/30MPa	CO <sub>2</sub> + 6% EtOH	-	-	1.4 ± 0.1 <sup>A</sup>
SFE 313.15 K/30MPa	CO <sub>2</sub> + 4% Ac	-	-	0.3 ± 0.2 <sup>BC</sup>
SFE 313.15 K/30MPa	CO <sub>2</sub> + 4% Ac:EtOH	-	-	1.7 ± 0.7 <sup>A</sup>

<sup>1</sup>SFE – supercritical fluid extraction; <sup>2</sup>Hx:IPA – hexane:isopropanol (50:50 v/v); Ac – acetone; Ac:EtOH – acetone:ethanol (50:50 v/v); EtOH – ethanol; Wtr – water; CO<sub>2</sub> – carbon dioxide; <sup>3</sup>Markom et al. (2007); <sup>4</sup>Angus, Armstrong and De Reuck (1976); <sup>5</sup>Same letter in same column indicates no statistical difference ( $p < 0.05$ ).

Soxhlet extraction provided highest yields. Temperature, solvent recycling, and solute/solvent interactions applied in the Soxhlet method contribute to the high solubilization of the raw material compounds. Also, the extraction at solvent boiling temperature causes it to reach active sites within the solid matrix, facilitating solubilization of the compounds (MARKOM et al., 2007). The Sox-Wtr sample presented the best  $X_0$  result ( $13.8 \pm 0.7\%$ ); however, due to its high polarity, the water is a non-selective solvent, thus this extract must present a high degree of compounds such as proteins and minerals as  $\text{CaCO}_3$ , widely present in crustaceans waste (MAZZUTTI et al., 2012). When comparing the LPE techniques employed, extractions with EtOH and Ac:EtOH with the Sox obtained the highest yields, of  $5.6 \pm 0.3\%$  and  $4.7 \pm 0.2\%$ , respectively. Considering the use of the same solvents in extractions performed with methods using low temperatures, UE (Ac -  $1.7 \pm 0.1\%$ ; EtOH -  $2.9 \pm 0.1\%$ ; and Ac:EtOH -  $2.9 \pm 0.1\%$ ) and Mac (Ac -  $1.4 \pm 0.1\%$ ; EtOH -  $3.28 \pm 0.01\%$ ; and Ac: EtOH -  $3.6 \pm 0.5\%$ ), did not have significant differences in the values of  $X_0$  among them. The extractions with Ac presented the lowest values of  $X_0$ ,  $1.4 \pm 0.1\%$ ,  $1.7 \pm 0.1\%$  and  $2.3 \pm 0.2\%$ , respectively, for UE, Mac, and Sox. These results also indicate that solvents of higher polarity lead to higher extraction yields, suggesting that compounds present in vegetable matrix have intermediate to high polarity. Mezzomo et al. (2011) also obtained the highest values of  $X_0$  for Sox-EtOH and, as in this work, the values of  $X_0$  for Mac-EtOH and UE-EtOH did not differ significantly in the case of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. Paulensis*) residue extraction.

Addition of Ac to EtOH (Ac:EtOH, 50/50 v/v) proved to be efficient, because in all applied techniques there was an increase of  $X_0$  compared to techniques using only Ac as solvent. This occurs due to the extraction with two or more solvents causing the polarity to become intermediate, increasing extraction efficiency (SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006).

Values of  $X_0$  and  $\text{CO}_2$  density for each supercritical  $\text{CO}_2$  extraction condition are also presented in Table 5.1. Due to the high degree of selectivity of SFE, the  $X_0$  values obtained by SFE were the lowest among all the evaluated techniques. This behavior is frequently observed (LÓPEZ et al., 2004); when there is a large disparity in values, it is convenient to statistically evaluate the results of  $X_0$  for LPE and SFE separately (ANDRADE et al., 2012; BENELLI et al., 2010).

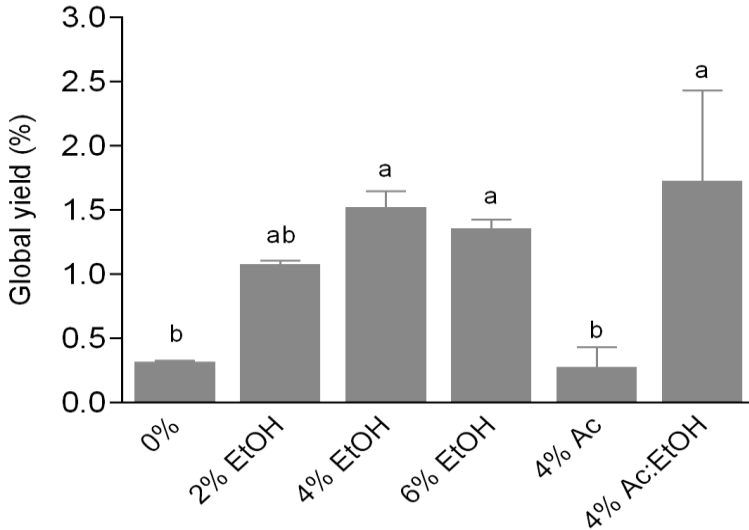
The highest global extraction yield with SFE ( $0.37 \pm 0.02\%$ ) was obtained at 20 MPa, 333.15 K, and solvent density of  $0.725 \text{ g/cm}^3$ . This value is statistically equal to the other conditions tested with pure  $\text{CO}_2$

(99%), except for the condition of 10 MPa and 333.15 K in assays with pure CO<sub>2</sub>. In this condition, the lowest solvent density was observed (0.290 g/cm<sup>3</sup>), and consequently the lowest value of X<sub>0</sub> (0.019 ± 0.005%). Mazzutti et al. (2012) observed a similar behavior in SFE of sun mushroom compounds (*Agaricus brasiliensis*).

CO<sub>2</sub> is a non-polar solvent; therefore, it preferably extracts non-polar compounds. Thus, the addition of a polar co-solvent causes polar compounds not initially solubilized by CO<sub>2</sub> to be extracted by mixing it with the co-solvent. EtOH is a food grade organic solvent commonly used as a co-solvent in SFE with the aim of increasing retrieval efficiency of polar compounds. Thus, EtOH was selected for use as a co-solvent due to its aforementioned characteristics and the overall yield results presented through LPE. The effects of 2%, 4%, and 6% (w/w) of EtOH under the 30 MPa and 313.15 K were evaluated. Ac and Ac:EtOH solvents were also tested in a concentration of 4%.

Figure 5.2 presents the X<sub>0</sub> values for the blue crab extracts using organic solvents as co-solvent. The use of EtOH promoted a significant increase in X<sub>0</sub>, from 0.32 ± 0.01% to 1.08 ± 0.02%, 1.5 ± 0.1% and 1.4 ± 0.1%, at concentrations of 2%, 4%, and 6% (w/w), respectively. Increasing solvent concentration from 2 to 4% increased the extraction yield, but the increase from 4 to 6% of EtOH did not differ significantly. The same behavior was not observed by Sánchez-Camargo et al. (2012) when studying the use of EtOH as co-solvents in SFE with shrimp (*P. paulensis*). They observed an increase in extraction yield with the increase in EtOH concentration. The use of Ac at 4% as co-solvent did not promote a significant increase of X<sub>0</sub> when compared to SFE without a co-solvent. Instead, the use of 4% Ac:EtOH mixture promoted a yield increase that was not significantly different from using EtOH at 4 and 6%.

Figure 5.2 – Global yield ( $X_0$ ) from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste extracts obtained through supercritical CO<sub>2</sub> using ethanol (EtOH), acetone (Ac) and acetone:etanol (Ac:EtOH - 50:50 v/v) as co-solvent. Same letter in same column indicates no statistical difference ( $p < 0.05$ ).



The yield increases with the use of co-solvents due to the greater solubilization of polar compounds in the organic solvent-CO<sub>2</sub> mixture, which does not occur when pure CO<sub>2</sub> is used. Generally, the type of co-solvent has a greater impact on the extraction efficiency than its concentration, due to the type of matrix-compound interaction and the co-solvent physicochemical parameters (HOLLENDER et al., 1997).

### 5.2.3 Astaxanthin recovery and antioxidant activity

Antioxidant activity (%AA) of carotenoids is related to their ability to absorb the energy of singlet oxygen, causing its degradation, but also preventing other molecules or tissues from being damaged (MORTENSEN et al., 1997). Astaxanthin antioxidant activity has been demonstrated in studies, with greater activity than vitamin E,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin (KURASHIGE et al., 1990; MORTENSEN et al., 1997). It is believed that the antioxidizing properties of astaxanthin are responsible for many of its other properties, such as protection against

photo-oxidation by UV light, inflammation, cancer, ulcers, and aging-related diseases (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003).

Table 5.2 shows the results of astaxanthin yield ( $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{waste-d.b.}}$ ) and %AA, performed by  $\beta$ -carotene bleaching and DPPH methods of the blue crab waste extracts, obtained by LPE and with supercritical  $\text{CO}_2$ . The %AA results were compared to the commercial astaxanthin (AST -  $73.9 \pm 0.4\%$ ) and a common synthetic antioxidant, dibutylhydroxytoluene (BHT -  $99.4 \pm 0.5\%$ ). It can be seen in Table 5.2 that the technique and the solvent used have a great influence on the amount of extracted astaxanthin and on the antioxidant activity. It was not possible to correlate the amount of astaxanthin with the antioxidant activity, since each solvent and method extracts different types of astaxanthin and compounds that directly influence the extracts antioxidant activity.

Astaxanthin is found in different forms in crustacean waste, basically in three conformations: (a) free, highly unstable and susceptible to factors such as light, oxygen, acidity, and heat; (b) conjugated to proteins; and (c) esterified with one or two fatty acids, being the latter two forms more stable. Therefore, the astaxanthin antioxidant activity is strongly related to its conformation.

Table 5.2 – Astaxanthin yield from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste extracts obtained by low and high pressure methods and their antioxidant activity (%AA) and effective concentration at 50% (EC<sub>50</sub>).

Recovery method <sup>1</sup>	Solvent <sup>2</sup>	Solvent index <sup>3</sup>	polarity	CO <sub>2</sub> density (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>4</sup>	Astaxanthin (µg/g <sub>waste-db</sub> ) <sup>5</sup>	%AA (β-carotene) <sup>5,6</sup>	%AA (DPPH) <sup>5,7</sup>	EC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>5,8</sup>
Soxhlet	Hx:IPA	1.95	-	-	23.1 ± 4.0 <sup>cd</sup>	8 ± 3 <sup>h</sup>	31 ± 1 <sup>b</sup>	817 ± 15 <sup>a</sup>
	Ac	5.10	-	-	36.4 ± 2.8 <sup>b</sup>	99 ± 1 <sup>a</sup>	36 ± 1 <sup>a</sup>	683 ± 36 <sup>bc</sup>
	Ac:EtOH	5.15	-	-	42.2 ± 2.4 <sup>ab</sup>	95.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	31 ± 3 <sup>b</sup>	765 ± 73 <sup>ab</sup>
	EtOH	5.20	-	-	47.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	20 ± 3 <sup>g</sup>	38.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	664 ± 5 <sup>c</sup>
	Wtr	9.00	-	-	21.2 ± 1.3 <sup>d</sup>	52 ± 4 <sup>e</sup>	-	-
Maceration	Ac	5.10	-	-	22.6 ± 0.2 <sup>cd</sup>	62 ± 4 <sup>d</sup>	7 ± 1 <sup>fg</sup>	> 1000
	Ac:EtOH	5.15	-	-	11.9 ± 0.8 <sup>e</sup>	45 ± 2 <sup>e</sup>	11 ± 4 <sup>ef</sup>	> 1000
	EtOH	5.20	-	-	24.5 ± 1.2 <sup>cd</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>h</sup>	18 ± 2 <sup>cd</sup>	> 1000
	Ac	5.10	-	-	21.6 ± 3.3 <sup>d</sup>	97 ± 3 <sup>a</sup>	15 ± 1 <sup>de</sup>	> 1000
	Ac:EtOH	5.15	-	-	21.0 ± 0.1 <sup>d</sup>	70 ± 5 <sup>c</sup>	36.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	717 ± 7 <sup>bc</sup>
Ultrasound	EtOH	5.20	-	-	28.9 ± 3.2 <sup>c</sup>	5 ± 1 <sup>h</sup>	21 ± 3 <sup>c</sup>	> 1000
SFE 333.15 K/10 MPa	CO <sub>2</sub>	-	-	0.290	-	-	-	-
	CO <sub>2</sub>	-	-	0.629	1.22 ± 0.03 <sup>g</sup>	18 ± 6 <sup>ef</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>ghi</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub>	-	-	0.725	2.65 ± 0.08 <sup>fg</sup>	4.1 ± 0.2 <sup>h</sup>	2.1 ± 0.6 <sup>hi</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub>	-	-	0.830	2.55 ± 0.14 <sup>fg</sup>	1.9 ± 0.6 <sup>h</sup>	6.3 ± 0.2 <sup>gh</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub>	-	-	0.840	1.07 ± 0.01 <sup>g</sup>	7.0 ± 0.2 <sup>h</sup>	1.1 ± 0.6 <sup>i</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub>	-	-	0.910	2.69 ± 0.05 <sup>fg</sup>	5.2 ± 0.4 <sup>h</sup>	7.9 ± 1.6 <sup>i</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub> + 2% EtOH	-	-	-	11.5 ± 0.5 <sup>c</sup>	8.6 ± 0.7 <sup>h</sup>	7.4 ± 0.4 <sup>f</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub> + 4% EtOH	-	-	-	24.5 ± 0.9 <sup>cd</sup>	6.1 ± 0.8 <sup>h</sup>	9 ± 2 <sup>i</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub> + 6% EtOH	-	-	-	20.7 ± 0.3 <sup>d</sup>	6.4 ± 0.8 <sup>h</sup>	2.4 ± 0.6 <sup>ghi</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub> + 4% Ac	-	-	-	9.1 ± 0.1 <sup>ef</sup>	84 ± 2 <sup>g</sup>	8 ± 1 <sup>i</sup>	> 1000
	CO <sub>2</sub> + 4% Ac:EtOH	-	-	-	24.5 ± 0.5 <sup>cd</sup>	35 ± 3 <sup>i</sup>	8 ± 1 <sup>i</sup>	> 1000
	AST	-	-	-	-	73.9 ± 0.4 <sup>c</sup>	-	-
	BHT	-	-	-	-	99.4 ± 0.5 <sup>ab</sup>	-	-

<sup>1</sup>SFE – supercritical fluid extraction; AST – commercial astaxanthin; BHT – dibutylhydroxytoluene; <sup>2</sup>Hx:IPA – hexane:isopropanol (50:50 v/v); Ac – acetone; Ac:EtOH – acetone:ethanol (50:50 v/v); EtOH – ethanol; Wtr – water; CO<sub>2</sub> – carbon dioxide; <sup>3</sup>Mankom et al. (2007); <sup>4</sup>Angus, Armstrong and De Reuck (1976); <sup>5</sup>Same letter in same column indicates no statistical difference ( $p < 0.05$ ); <sup>6</sup>%AA referent to β-carotene bleaching method obtained after 120 min-reaction at extract concentration of 5000 µg/mL; <sup>7</sup>%AA referent to DPPH method at extract concentration of 500 µg/mL; <sup>8</sup>Effective concentration at 50%, based on DPPH method.

Comparing the LPE methods, the Sox method not only obtained the best  $X_0$  results (Table 5.1), but also the highest astaxanthin yield and the best %AA values, for both methods,  $\beta$ -carotene bleaching and DPPH. Probably, the high temperatures used in the Sox extraction process had a positive influence on the capacity of the extracts in sequestering free radicals. Sox method also presented the highest astaxanthin yield for all solvents tested, with values for EtOH, Ac:EtOH and Ac of  $47.1 \pm 0.6 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ ,  $42.2 \pm 2.4 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$  and  $36.4 \pm 2.8 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ , respectively. The higher results of %AA were found in  $\beta$ -carotene bleaching method with Sox-Ac ( $99 \pm 1\%$ ), UE-Ac ( $97 \pm 3\%$ ) and Sox-Ac:EtOH ( $95.1 \pm 0.2\%$ ), these results are better than the standard AST and similar to BHT. According to the DPPH method, Sox-EtOH ( $38.1 \pm 0.3\%$ ), Sox-Ac ( $36 \pm 1\%$ ) and UE-Ac:EtOH ( $36.6 \pm 0.5\%$ ) presented the best %AA values. Sox-EtOH, Sox-Ac and UE-Ac:EtOH extracts also presented the lowest effective concentration at 50% ( $\text{EC}_{50}$ ), of  $664 \pm 5$ ,  $683 \pm 36$  and  $717 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ , respectively. Mezzomo (2012) also obtained the best %AA values for extractions performed with Sox when compared to maceration and ultrasonic techniques using acetone and ethanol as solvents in extracts obtained from shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*).

Extracts presented best %AA values evaluated by  $\beta$ -carotene bleaching method, when compared to DPPH, because non-polar compounds as astaxanthin are better detectable by the carotenoidic method ( $\beta$ -carotene bleaching method). Furthermore, DPPH method results may have been influenced for other non-carotenoidic compounds. Therefore, future evaluations will be carried out based only on the comparison of %AA with the  $\beta$ -carotene bleaching method.

EtOH solvent was the most effective solvent in extracting astaxanthin in all evaluated LPE methods: Sox ( $47.1 \pm 0.6 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ ), Mac ( $24.5 \pm 1.2 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ ), and UE ( $28.9 \pm 3.2 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ ). The Sox-EtOH astaxanthin yield value did not differ significantly from extraction with Ac:EtOH ( $42.2 \pm 2.4 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ ) or from the Mac-EtOH method with Ac ( $22.6 \pm 0.2 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$ ). These values were higher than those found by Shahidi e Synowiecki (1991), of  $13.99 \pm 0.20 \mu\text{g/g}_{\text{waste}}$ , for snow crab (*C. opilio*) waste extract, and shrimp (*P. borealis*) waste extract ( $14.77 \pm 0.25 \mu\text{g/g}_{\text{waste}}$ ).

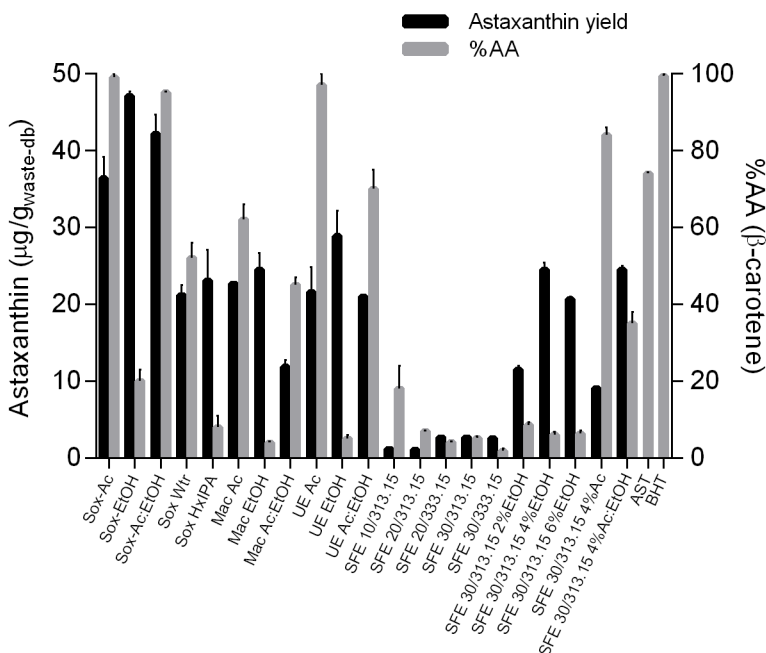
Although EtOH obtains the best results in astaxanthin extraction, it is possible to evaluate through Table 5.2 that the solvent Ac has the highest ability to extract stable forms of astaxanthin, with a greater ability to counter free radical activity, because in all LPE methods the

extraction with Ac presented the highest %AA values of  $99 \pm 1\%$ ,  $97 \pm 3\%$ , and  $62 \pm 4\%$ , for Sox, UE and Mac, respectively.

Mixtures of the solvents Ac and EtOH, provided increase of extracted astaxanthin only in Sox method, where the astaxanthin value found for Sox-Ac was of  $36.4 \pm 2.8 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{waste-db}}$  and for Sox-Ac:EtOH of  $42.2 \pm 2.4 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{waste-db}}$ , an increase of approximately 14%. For UE the values were constant, of  $21.6 \pm 3.3 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{waste-db}}$  and  $21.0 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{waste-db}}$  to UE-Ac and UE-Ac:EtOH, respectively. On the other hand, %AA increased using the mixture Ac:EtOH in all methods, when compared to EtOH only. The %AA value of Sox-EtOH increased from  $20 \pm 3\%$  to  $95.1 \pm 0.2$  (Sox-Ac:EtOH). In Mac it was from  $4.0 \pm 0.3\%$  using only EtOH to  $45 \pm 2\%$  with Ac:EtOH and in UE method the increase was from  $5 \pm 1\%$  (only EtOH) to  $70 \pm 5\%$  (with Ac:EtOH). The extraction with two or more solvents causes the system polarity to become intermediate, increasing extraction efficiency (SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006). Extraction of Sox-Wtr obtained an intermediate value of %AA ( $52 \pm 4\%$ ) and astaxanthin yield ( $21.2 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{waste-db}}$ ) this fact confirms that, due to the high value of  $X_0$  found (Table 5.1), the high polarity of water may be related to the extraction of other compounds, such as proteins and minerals. Extraction with Sox-Hx:IPA also obtained an intermediate value for astaxanthin yield ( $23.1 \pm 4.0 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{waste-db}}$ ) and low %AA ( $8 \pm 3\%$ ). These behavior reports can be seen in Figure 5.3.



Figure 5.3 - Astaxanthin yield from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste extracts obtained by different methods (Soxhlet – Sox; Mac – Maceration; UE – Ultrasound; SFE – extraction with supercritical CO<sub>2</sub>) and solvents (Ac – acetone; EtOH – ethanol; Ac:EtOH – acetone:ethanol (50:50 v/v); Hx:IPA – hexane:isopropanol (50:50 v/v); Wtr – water) and extracts, commercial astaxanthin (AST) and dibutylhydroxytoluene (BHT) antioxidant activity (%AA).



Astaxanthin yield in extracts obtained by SFE with CO<sub>2</sub> were low when compared to LPE and show no variation behavior with changes in pressure or temperature. The same occurs with %AA, except for extraction at 313.15 K and 10 MPa (18 ± 6% of %AA). All co-solvent extractions showed an increase in astaxanthin extraction and %AA. SFE with CO<sub>2</sub> + 4% of EtOH and 4% of Ac:EtOH showed the highest values, with no significant differences, the astaxanthin yield was of 24.5 ± 0.9 µg/g<sub>waste-db</sub> and 24.5 ± 0.5 µg/g<sub>waste-db</sub>, respectively. SFE using pure EtOH as co-solvent did not present a good %AA. Extractions using Ac as co-solvent presented better results of %AA, 84 ± 2% using only Ac and 35 ± 3% with Ac:EtOH. SFE extraction technique using 4% Ac as co-solvent proved to be efficient in obtaining a highly pure extract in

stable astaxanthin form, because even with a global yield of  $0.3 \pm 0.2\%$  and  $9.1 \pm 0.1 \mu\text{g/g}_{\text{waste-db}}$  of astaxanthin yield it obtained %AA of  $84 \pm 2\%$ , superior to commercial astaxanthin, close to BHT and Sox-Ac.

Based on the considerations above, it is possible to conclude that different solvents and extraction techniques are able of extracting different compounds. Therefore, depending on the application of extracts, it is important to study not only the amount of astaxanthin and other compounds, but also its biological activity. The results obtained in this study indicate that extracts obtained from blue crab waste have a high concentration of astaxanthin and antioxidant activity, similar to commercial products, and can be used as products in the pharmaceutical and food industry.

#### 5.3.4 Influence of depigmentation (astaxanthin extraction) methods on chitosan extracted from blue crab waste

Chitin degree of acetylation (DA) is around 0.90 and this value depends on the method used for its recovery from raw material. Chitosan is the fully or partially *N*-deacetylated form from chitin, with a typical DA of less than 0.35 or more than 0.65 of deacetylation degree (DD), where  $DD = 1 - DA$  (DONG et al., 2002; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). One of the main properties of chitosan in relation to chitin is the enhanced solubility (SASHIWA et al., 2002). DD results for the chitosan obtained in this study are shown in Table 5.3. Chitosan depigmented by different methods presented close DD values, between 73.2% to 75.9%, for the CM-AE and CSH-E, respectively. DD value for a commercial sample is approximate to that described by the chitosan supplier of  $\geq 75\%$  of deacetylation.

Table 5.3 - Deacetylation Degree (DD%) of the chitosan samples.

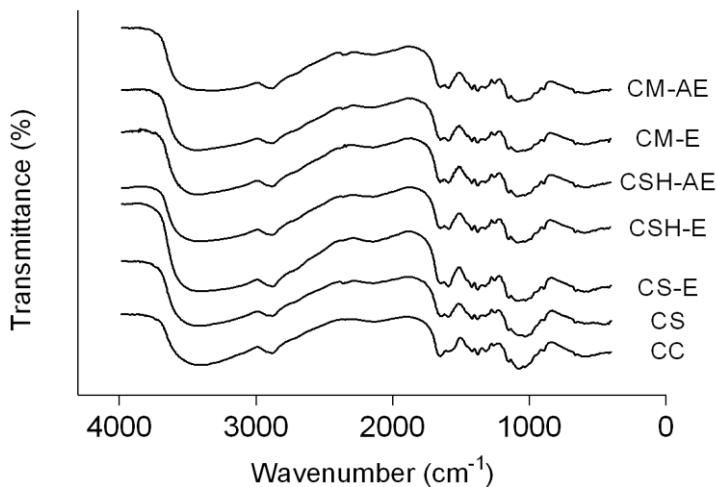
Chitosan sample <sup>1</sup>	Deacetylation Degree (%)
CC	$74.5 \pm 0.1^a$
CS	$73.3 \pm 0.9^a$
CS-E	$74.2 \pm 0.2^a$
CSH-E	$75.9 \pm 0.3^a$
CSH-AE	$75.0 \pm 0.5^a$
CM-E	$74.7 \pm 0.3^a$
CM-AE	$73.2 \pm 2.5^a$

<sup>1</sup>CC – Commercial chitosan; CS – Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub>; CS-E - Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub> using EtOH as co-solvent;

CSH-E - Chitosan depigmented by Soxhlet method using EtOH as solvent;  
CSH-AE - Chitosan depigmented by Soxhlet method using Ac:EtOH as solvent;  
CM-E - Chitosan depigmented by maceration method using EtOH as solvent;  
CM-AE - Chitosan depigmented by maceration method using Ac:EtOH as solvent.

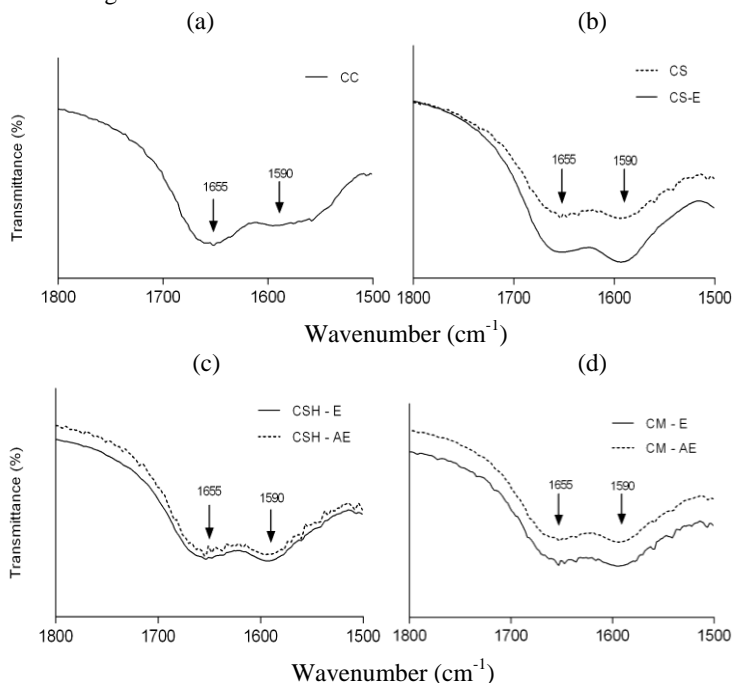
FTIR can be used to characterize chitosan samples, providing important information, since this technique is particularly sensitive to conformational changes and the intra and intermolecular reorganization involving the active groups of compounds (BRANCA et al., 2016). Figure 5.4 presents the chitosan samples FTIR spectra obtained from different methods of depigmentation. Similar bands were found for all samples and FTIR spectra are characteristic of chitosan described in the specialized literature (BRUGNEROTTO et al., 2001a; CAHÚ et al., 2012; CAMPANA-FILHO et al., 2007). The band  $3570\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  is characteristic of axial stretching vibrations of OH groups. The peaks of  $2920$  and  $2880\text{ cm}^{-1}$  correspond to symmetric or asymmetric C-H bond stretching vibrations. Other bands were also observed: at  $1465$  and  $1423\text{ cm}^{-1}$  for the vibration of -OH and -CH<sub>2</sub>; the bands between  $1250$  and  $1379\text{ cm}^{-1}$  correspond to vibration of primary ( $1321\text{ cm}^{-1}$ ), secondary ( $1260\text{ cm}^{-1}$ ) and tertiary ( $1340\text{-}1250$  and  $1379\text{ cm}^{-1}$ ) C-N bonds; at  $1150$  and  $896\text{ cm}^{-1}$  correspond to the symmetric stretching of C-O-C; and at  $1070\text{ cm}^{-1}$  and  $1020\text{ cm}^{-1}$  associated to C-O stretching vibration (ESPINOSA-ANDREWS et al., 2010; MANO; KONIAROVA; REIS, 2003; XU et al., 2005).

Figure 5.4 - FTIR spectra of chitosan obtained from blue crab waste (*Callinectes sapidus*) depigmented by different methods. CC – Commercial chitosan; CS – Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub>; CS-E - Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub> using EtOH as co-solvent; CSH-E - Chitosan depigmented by Soxhlet method using EtOH as solvent; CSH-AE - Chitosan depigmented by Soxhlet method using Ac:EtOH as solvent; CM-E - Chitosan depigmented by maceration method using EtOH as solvent; CM-AE - Chitosan depigmented by maceration method using Ac:EtOH as solvent.



FTIR spectroscopy technique is useful to prove the hydrolysis of acetylated groups in the chitin structure by reducing the stretching band of the amide carbonyl. Due the prevalence of NH<sub>2</sub> groups, during the *N*-deacetylation of chitin the band at 1655 cm<sup>-1</sup> gradually decreased, while that at 1590 cm<sup>-1</sup> increased. Figure 5.5 shows the bands at 1655 cm<sup>-1</sup> (amide I) and 1590 cm<sup>-1</sup> (N-H amine deformation) of chitosan samples. Figure 5.5 spectra suggest that the commercial sample (CC) suffered the highest hydrolysis in the acetylated groups and the CS-E (with supercritical CO<sub>2</sub> depigmentation using EtOH as co-solvent) sample underwent the lowest deacetylation. The other samples, CS, CSH-E, CSH-AE, CM-E, and CM-AE, presented similar peaks at 1655 cm<sup>-1</sup> and 1590 cm<sup>-1</sup>.

Figure 5.5 - FTIR spectra bands at  $1655\text{ cm}^{-1}$  and  $1590\text{ cm}^{-1}$  from blue crab waste (*Callinectes sapidus*) chitosan, depigmented by different methods. (a) CC – Commercial chitosan; (b) CS – Chitosan depigmented by supercritical  $\text{CO}_2$  and CS-E - Chitosan depigmented by supercritical  $\text{CO}_2$  using EtOH as co-solvent; (c) CSH-E - Chitosan depigmented by Soxhlet method using EtOH as solvent and CSH-AE - Chitosan depigmented by Soxhlet method using Ac:EtOH as solvent; (d) CM-E - Chitosan depigmented by maceration method using EtOH as solvent and CM-AE - Chitosan depigmented by maceration method using Ac:EtOH as solvent.



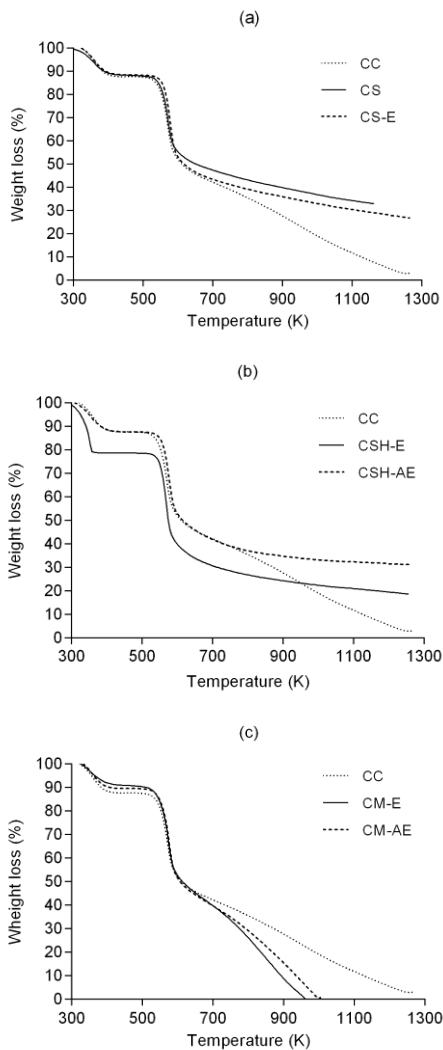
Chitosan mass changes as a function of temperature can be measured through thermogravimetric analyses (TG), these tests may be performed in inert (nitrogen) or oxidative (air or similar) atmosphere. In polymeric compounds such as chitosan, TG is used to assess the loss of moisture and compounds, as well as intermolecular interactions and thermal stability of analyzed materials (ZENG; LU; XU, 2013). The chitosan TG curves obtained from blue crab waste depigmented by supercritical  $\text{CO}_2$ , Soxhlet, and maceration compared to commercial chitosan are shown in Figure 5.6. First degradation stage occurs due to water loss present in the samples. Except for the sample CSH-E, the first

stage was between 323.15 K and 417.15 K. The samples have a similar initial moisture content and weight loss in this stage was of approximately 10%. CSH-E presented the highest moisture, around 20%, with the first degradation stage from 313.15 K to 368.15 K.

Second degradation stage is caused by chitosan chains depolymerization, degradation of pyranose rings through dehydration and deamination, and finally ring-opening reaction (WANJUN; CUNXIN; DONGHUA, 2005; ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010). CS-E, CSH-E, and CSH-AE presented the second degradation stage between 493.15 K to 1263.15 K, with weight loss of 61%, 60% and 56%, respectively. For CS this stage was from 493.15 K to 1163.15 K with weight loss of 55%. The CM-E and CM-AE obtained a similar second degradation stage between 493.15 K to 693.15 K with weight loss of 49% for both. The second degradation stage for commercial sample (CC) was from 493.15 K to 783.15 K with weight loss of 50%.

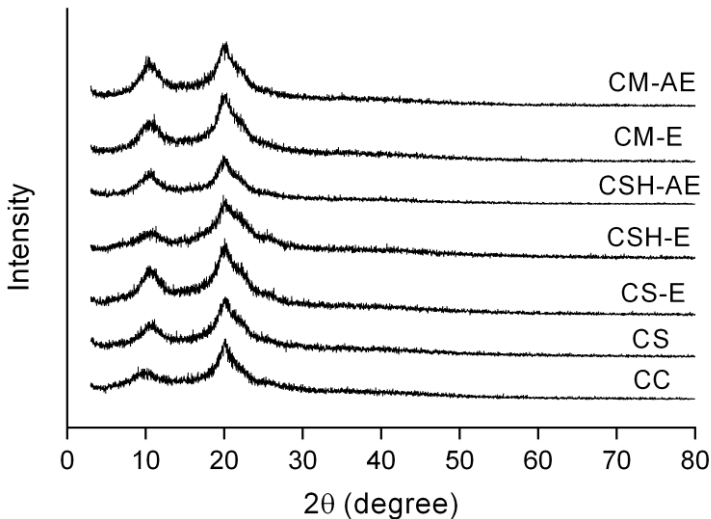
CC, CM-E, and CM-AE presented a third degradation stage. It was between 783.15 K and 1263.15 K for CC (weight loss: 33%); from 693.15 K to 973.15 K for CM-E (weight loss: 40%); and 693.15 K to 1003.15 K for CM-AE (weight loss: 40%). This third degradation stage refers to losing inorganic compounds. The weight loss of CC, CM-E, and CM-AE was approximately 100%, indicating a high purity degree of the sample because this indicates a larger amount of chitosan (ABDEL-RAHMAN et al., 2015). Thermogravimetric analyses allow to conclude that chitosan from blue crab waste is stable up to 493.15 K similar to the commercial sample, and that the chitosan depigmented by maceration method (CM-E and CM-AE) has high purity compared to other evaluated methods.

Figure 5.6 – Chitosan TG curves obtained from blue crab waste (*Callinectes sapidus*), depigmented by supercritical CO<sub>2</sub>, Soxhlet, and maceration compared to commercial chitosan. CC – Commercial chitosan; CS – Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub>; CS-E - Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub> using EtOH as co-solvent; CSH-E - Chitosan depigmented by Soxhlet method using EtOH as solvent; CSH-AE - Chitosan depigmented by Soxhlet method using Ac:EtOH as solvent; CM-E - Chitosan depigmented by maceration method using EtOH as solvent; CM-AE - Chitosan depigmented by maceration method using Ac:EtOH as solvent.



Using X-ray diffraction is appropriate to determine chitosan crystallinity indexes. X-ray diffractograms of chitosan from blue crab waste depigmented by different methods are shown in Figure 5.7. All chitosan samples present similar diffraction peaks at  $\approx 10^\circ$  ( $2\theta$ ) and a strongest reflection at  $\approx 20^\circ$  ( $2\theta$ ), representing a crystalline state. It seems that chitosan depigmentation methods did not affect the natural crystallinity of blue crab chitosan. Similar results were found by Nunthanid et al. (2001) in chitosan from crab shell (82% DD), Xu et al. (2005) in chitosan powder (90% DD), and Abdel-Rahman et al. (2015) in chitosan from shrimp shells.

Figure 5.7 – X-ray patterns for chitosan from blue crab waste (*Callinectes sapidus*) depigmented by different methods. CC – Commercial chitosan; CS – Chitosan depigmented by supercritical  $\text{CO}_2$ ; CS-E - Chitosan depigmented by supercritical  $\text{CO}_2$  using EtOH as co-solvent; CSH-E - Chitosan depigmented by Soxhlet method using EtOH as solvent; CSH-AE - Chitosan depigmented by Soxhlet method using Ac:EtOH as solvent; CM-E - Chitosan depigmented by maceration method using EtOH as solvent; CM-AE - Chitosan depigmented by maceration method using Ac:EtOH as solvent.

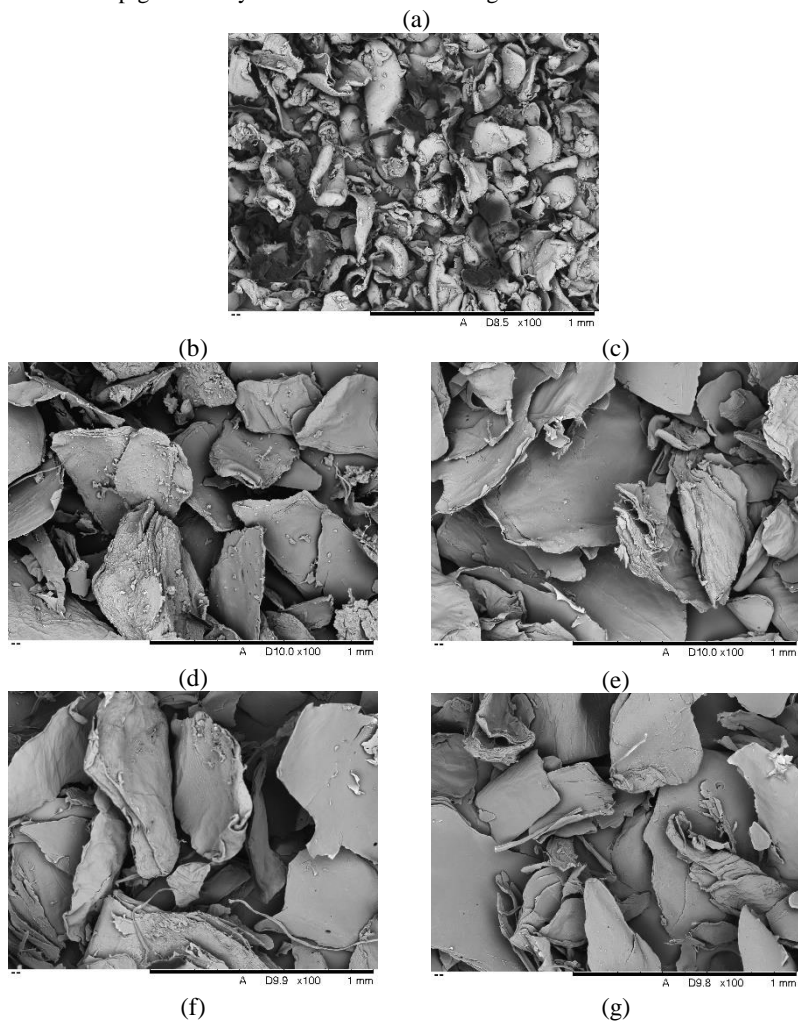


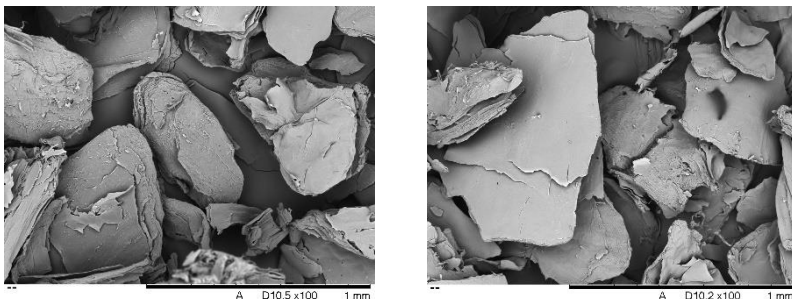
Scanning Electronic Microscopy (SEM) images of chitosan obtained from blue crab waste depigmented through different methods and a commercial chitosan sample are shown in Figure 5.8 zoomed 100x. It is possible to observe that the non-homogeneity morphologies



appear with irregular particles of different shapes and sizes and do not exhibit apparent microfibrillar structure. Commercial chitosan has less regular appearance, smaller particles and curved edges. Samples depigmented by supercritical CO<sub>2</sub> showed layers of crumbling flakes, chitosan depigmented by Soxhlet exhibited a more compact, denser structure, and the sample depigmented by maceration presents a layered structure. These denser chitosan structures with non-microfibrillar appearance were reported by other authors previously. Yen, Yang and Mau (2009) found similar structures in crab chitosan sample from China. Also, chitosan from shiitake stipes (fungus) did not show the microfibrillar structure in SEM (YEN; MAU, 2007).

Figure 5.8 – Scanning electronic microscopy of chitosan obtained from blue crab waste (*Callinectes sapidus*) depigmented by different methods. (a) CC – Commercial chitosan; (b) CS – Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub>; (c) CS-E - Chitosan depigmented by supercritical CO<sub>2</sub> using EtOH as co-solvent; (d) CSH-E - Chitosan depigmented by Soxhlet method using EtOH as solvent; (e) CSH-AE - Chitosan depigmented by Soxhlet method using Ac:EtOH as solvent; (f) CM-E - Chitosan depigmented by maceration method using EtOH as solvent; (g) CM-AE - Chitosan depigmented by maceration method using Ac:EtOH as solvent.





## 5.4 CONCLUSIONS

Recovery of compounds from blue crab waste may be a viable alternative for the use of a highly perishable residue. The choice of astaxanthin extraction method will depend on the product to be obtained. Low pressure extraction (LPE) with Soxhlet showed the best results in global extraction yield, astaxanthin recovery, and antioxidant activity. It is likely that heating the solvent during extraction was the main responsible for these results. Although ethanol is a solvent with greater ability to extract astaxanthin, it is possible to note from this study that acetone can extract higher amounts of stable astaxanthin. Instead of ethanol, extraction with acetone and the acetone:ethanol mixture presented better results of biological activity (antioxidant activity) in all evaluated methods.

Supercritical fluid extraction (SFE) with pure CO<sub>2</sub> for all evaluated parameters presented lower values when compared to the LPE methods. However, SFE using 4% of acetone as co-solvent showed low global yield and astaxanthin amount, but presented a good result of antioxidant activity. This indicates that this method can be used to extract highly concentrated stable astaxanthin.

After astaxanthin recovery, it is possible to obtain chitosan from blue crab depigmented waste. Different methods of depigmentation did not present great significant differences in the structure of chitosan obtained.

It is possible to conclude that the blue crab waste has great potential as raw material to recovery different compounds that can be used in the food and beverage, animal feed, and cosmetic industries.



## **CAPÍTULO 6: NANOENCAPSULAMENTO DE EXTRATO RICO EM ASTAXANTINA E ÁCIDOS GRAXOS DO RESÍDUO DE SIRI-AZUL (*Callinectes sapidus*) EM MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA E ESTUDO DA CITOTOXICIDADE**

### **Nanoencapsulation of astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste in polymeric chitosan matrix and cytotoxicity studies**

#### **ABSTRACT**

Blue crab (*Callinectes sapidus*) waste presents several compounds of industrial interest, such as astaxanthin, fatty acids and chitin, precursor of chitosan. Astaxanthin is a red pigment with diverse biological properties, but a highly unsaturated molecule and can be easily degraded. Chitosan can be used as an encapsulating polymer in order to preserve and improve the properties of astaxanthin. Therefore, the aim of the study was to nanoencapsulate the blue crab astaxanthin-rich extract (BC-AST) in chitosan matrix, both recovered from blue crab waste. The nanocapsules size, PDI and potential zeta with different concentrations of BC-AST and chitosan were evaluated. Also, MTT assay was performed to evaluate the BC-AST and nanocapsules cytotoxicity. The average particle size was below 284 nm with an encapsulation efficiency of approximately 99%. Nanocapsules from blue crab chitosan showed a smaller particle diameter than commercial chitosan. In cytotoxicity assay, BC-AST presented an increase in MDCK viable cells up to concentration of 0.20 mg/mL, but from this concentration the cellular viability decreases. Nanocapsules with both blue crab and commercial chitosan did not present cytotoxicity to MDCK cells at the concentrations studied.

**Keywords:** Blue crab waste; Astaxanthin; Chitosan; Nanocapsules; Cytotoxicity.

## 6.1 INTRODUCTION

Use of the blue crab (*Callinectes sapidus*) processing waste is an alternative source to obtain compounds that can be used as input in other industries. Among the main compounds that can be extracted from the blue crab waste are: (a) chitin, which can easily be transformed into chitosan by its alkaline deacetylation; (b) carotenoids, the main one of which is astaxanthin; and (c) essential fatty acids.

Carotenoids are pigments contributing to yellow, orange and red pigmentations. They are synthesized by plants, algae, bacteria and fungi, while animals and human incorporate them into their diets. Some of the most abundant carotenoids present in the human organism are  $\beta$ -carotene, lycopene, astaxanthin and lutein. Many studies report that a diet rich in carotenoids has been epidemiologically correlated with a lower risk for several diseases (KRINSKY; JOHNSON, 2005; NISHINO et al., 2000; STAHL; SIES, 2005; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004). Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- $\beta$ - $\beta$ -carotene-4,4'-dione) is a red-orange carotenoid pigment found in aquatic animals and has been gaining importance in the pharmaceutical and food industries. Currently, many studies have reported the benefits of astaxanthin to human healthy as, antioxidant (ANTUNES-VALCAREGGI; FERREIRA; HENSE, 2017; MEZZOMO et al., 2011; ZHAO et al., 2016), cardioprotective agent (GROSS; LOCKWOOD, 2004), protector of the skin against UV-induced photo-oxidation (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003; PAPAS, 1998), neuroprotector (MASOUDI et al., 2017), antitumor agent (JYONOUCHI et al., 2000; ONOGI et al., 1998) and kidney protector against alcohol effects (ALESCI et al., 2015). However, due highly unsaturated molecules, the astaxanthin can easily be degraded by thermal or oxidative processes during the manufacture and storage and shows very low bioavailability (MEOR MOHD AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011). Encapsulation process can be performed in order to protect its biological activity from environmental factors, enhance its physicochemical stability and solubility in polar solvents such as water (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004) and improve astaxanthin bioavailability (MEOR MOHD AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011).

Encapsulation process consists of the coating or incorporation of a compound or mixture (encapsulated) into a material or system (capsule). This technique allows to protect the encapsulated compound of oxidation and thermal degradation, to control its rate of release under certain conditions, to avoid volatilization, to inhibit microbiological

growth, to improve the sensorial quality and to provide increased solubility (FANG; BHANDARI, 2012; GÖKMEN et al., 2011; KAISER et al., 2015; NIELSEN et al., 2016). Microparticles and polymer nanoparticles are classified based on their dimensions. Microparticles average diameter ranges from 1 to 250  $\mu\text{m}$ , while the mean diameter of the nanoparticles are from 10 to 1000 nm (MUNDARGI et al., 2008). Different morphologies can be generated by encapsulation process, but the most frequent are: (a) in the microcapsule, the active compound is trapped in the center wrapped in a polymeric wall, forming a nucleated structure; (b) in the second morphology, the compound is distributed throughout the polymer matrix (FANG; BHANDARI, 2010).

Bioactive compounds may be encapsulated by different techniques and their choice depends, among other factors, on the nature of the polymer and the compound to be encapsulated, the intended use and the desired properties on the final product (JAIN, 2000). The encapsulation technique by spontaneous emulsification is easily reproducible and widely used in a number of research groups (BILATI; ALLÉMANN; DOELKER, 2005; CALVO et al., 1997; GOVENDER, 1999; GOYCOOLEA et al., 2012; MURAKAMI et al., 1999). This technique consists in the formation of a homogeneous nucleus, formed by the bioactive compound dissolved in an organic phase, acetone and ethanol, added to an aqueous phase, forming an oil and water (o/w) nanoemulsion stabilized by a surfactant adsorbed at the interface o/w. Subsequent or during the formation of the nanoemulsion, a water soluble polymer may be incorporated, with the purpose of coating the nanoemulsion, effectively forming nanocapsules (GOYCOOLEA et al., 2012). The surfactant migration mechanism allows spontaneous formation of the nanoemulsion droplets.

Chitosan is the chitin derivative most used in industry and has some advantages over other encapsulating polymers, because (a) it is a natural product; (b) it has gradual release of several drugs; (c) has the ability to adhere to the gastric mucosa; (d) nontoxic; (e) degradable and biocompatible; (f) its degradation does not generate toxic products; (g) usually does not cause allergic reactions; (h) increases permeability with decreasing pH; and (i) it has versatility in applications (ESTEVINHO et al., 2013). These characteristics make it attractive for applications in medicine, pharmacy and food industries (HIRANO et al., 1987; LIANG et al., 2017; RAFIQUE et al., 2016).

*In vitro* cytotoxicity assays evaluate the toxicity of a compound or mixture to cells in culture, this evaluation is usually performed by detecting the number of cells that remain viable after the incubation

period. The method of determining cytotoxicity should be simple, economical and predict *in vivo* toxicity through a substitute marker, this should indicate the number of viable cells as compared to untreated control samples. The methods for estimating the number of viable cells in culture are usually based on the measurement of an indicator of cellular metabolic activity (RISS; MORAVEC; NILES, 2011).

There are few scientific studies related to the extraction and use of the blue crab compounds. Therefore, the aim of the present study was to nanoencapsulate astaxanthin-rich extract in chitosan matrix, both recovery from the blue crab waste and evaluated the cytotoxicity of the astaxanthin extracts and nanocapsules.

## 6.2 MATERIAL AND METHODS

### 6.2.1 Astaxanthin and fatty acids recovery

Blue crab (*Callinectes sapidus*) waste composed essentially of crab carapaces and legs was kindly provided by local small-scale crab meat producers from the city of Laguna, Santa Catarina State, Brazil. The residue, collected once in November 2014, was treated based on methods described by Holanda and Netto (2006) and Mezzomo et al. (2011).

Recovery of astaxanthin-rich extract from blue crab (BC-AST) was performed by Soxhlet (Sox) apparatus according to method 920.39C - A.O.A.C. (2005). Extraction was performed during 8 h at the solvent boiling temperature. The proportion used was 5 g of sample to 150 mL of Acetone:Ethanol mixture, 50:50 v/v (Sox – Ac:EtOH), in a 250 mL Soxhlet extractor. Astaxanthin extraction method and solvent were selected based on the results obtained in Chapter 5 of this document. Solvent removal process was performed in a rotary evaporator (Mod. 550 and 802, Fisatom, Brazil) with cooling (MQBTZ99-20, Microquímica, Brazil) and vacuum control (NT 613, Nova Técnica, Brazil). The extraction was performed in duplicate and the result expressed as mean value  $\pm$  standard deviation.

#### 6.2.1.1 Astaxanthin content

Astaxanthin content in BC-AST was determined through spectrophotometric methods according to Tolasa, Cakli, and Ostermeyer (2005) modified by Sánchez-Camargo et al. (2012). Standard curve was built using standard HPLC astaxanthin ( $\geq 97\%$ -HPLC, Sigma Aldrich



Co.) in Acetone:Ethanol mixture, 50:50 v/v, and absorbance was measured at the wavelength of 477 nm. Equation 6.1 was obtained from the astaxanthin standard curve.

$$C_{AST} = 6.7157 \times Abs_{477nm} \quad r^2 = 0.99 \quad (6.1)$$

in which,  $C_{AST}$  is the concentration of astaxanthin in the BC-AST expressed in  $\mu\text{g/mL}$  and  $Abs_{477nm}$  is its absorbance value at 477 nm.

In order to calculate BC-AST encapsulation efficiency, the nanocapsules were immersed in hexane. Thus, for the determination of non-encapsulated astaxanthin content the standard curve was built using standard HPLC astaxanthin ( $\geq 97\%$ -HPLC, Sigma Aldrich Co.) in hexane at the wavelength of 472 nm.

$$C_{AST} = 6.6303 \times Abs_{472nm} \quad r^2 = 0.99 \quad (6.2)$$

in which,  $C_{AST}$  is the concentration of astaxanthin in the BC-AST expressed in  $\mu\text{g/mL}$  and  $Abs_{472nm}$  is its absorbance value at 472 nm.

### 6.2.1.2 Fatty acids profile

Total lipid analysis was performed according to methods described by Bligh and Dyer (1959). The BC-AST fatty acids composition was determined by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) according the Ce 1f-96 Method of A.O.C.S. (2002).

### 6.2.2 Chitosan recovery

Chitin recovery from blue crab waste was performed following BC-AST extraction. After the depigmentation process, crude chitin was obtained according to Shahidi and Synowiecki (1991). Briefly, samples were demineralized in 7% HCl, ratio of 1:10 (w/v) for 1 h at room temperature, then passed through the washing process with distilled water until the wash residue becomes neutral. Deproteinization of the samples was carried out in alkaline medium with 2% KOH, ratio of 1:20 (w/v) at 363.15 K for 2 h, after the samples were washed with distilled water until the residue becomes neutral. Finally, the samples were submitted to air drying (DL-SE, DeLeo, Brazil) for 16 h at 333.15 K. Chitin recovery process was performed in duplicate.

The chitin deacetylation was performed according to Kurita (2001) and Sagheer et al. (2009). Briefly, 1 g of crude chitin was treated

with 15 mL of 60% NaOH at 383.15 K. Then, the samples were washed in distilled water until becomes neutral and air dried (DL-SE, DeLeo, Brazil) for 16 h at 333.15 K. Finally, the blue crab chitosan and commercial chitosan (from shrimp shells, practical grade, molecular weight: 190000-375000 Da,  $\geq 75\%$  deacetylated; Sigma-Aldrich Co.) were purified in 2% acetic acid solution and then washed in distilled water and dried for 16 h at 333.15 K.

#### 6.2.2.1 N-deacetylation degree (DD)

Deacetylation degree (DD) determination of the chitosan was performed using an infrared spectrophotometer model IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Japan) equipped with detector DTGS (deuterated triglycine sulfate). Samples were prepared with potassium bromide (KBr) tablets. The DD% was calculated according to Equation 6.3 described by Sabnis and Block (1997):

$$DD\% = 97.67 - \left( \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times 26.486 \right) \quad (6.3)$$

where,  $A_{1655}$  is sample absorbance at  $1655 \text{ cm}^{-1}$ ; e  $A_{3450}$  is sample absorbance at  $3450 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 6.2.2.2 Viscosity average molecular weight

Relative viscosity of blue crab and commercial chitosan with different concentrations in 0.3 M acetic acid and 0.2 M sodium acetate were measured at 298.15 K (inclination angle,  $50^\circ$ ) using an AMVn automated rolling ball microviscosimeter (Anton Paar, Ostfildern, Germany) with a programmable tube angle based on the principle of the rolling ball time (the time required for the steel ball to roll inside a calibrated 1.6 mm diameter capillary). The average results obtained from four runs was expressed as viscosity average molecular weight ( $\overline{M}_v$ ) using the Mark-Houwink parameters (BRUGNEROTTO et al., 2001b; RINAUDO, 2006; RINAUDO; MILAS; DUNG, 1993).

### 6.2.3 Preparation of nanoformulations

Nanoformulations were prepared by spontaneous emulsification according to Calvo et al. (1997) and Goycoolea et al. (2012). Briefly, 250  $\mu\text{L}$  of a 100 mg/mL ethanolic lecithin solution (Epikuron 145 V,

Cargill texturing solutions Deutschland GmbH & Co. KG, Hamburg, Germany) was mixed with 256  $\mu\text{L}$  of the BC-AST solution (diluted in Ac:EtOH, 50:50) in three different concentrations 10, 20 and 40 mg/mL (final concentration in nanoformulations, after evaporation of the solvent: 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL). This solution was supplemented with 62.5  $\mu\text{L}$  of Miglyol 812 N (Sasol GmbH, Witten, Germany) and 4.75 mL of acetone, this was called organic phase. Then, the organic phase was immediately poured into 10 mL of blue crab (BC) and commercial (C) chitosan aqueous solution in two different concentrations (0.25 and 0.50 mg/mL). The final solution was concentrated in a rotavapor (Büchi R-210, Büchi Labortechnik GmbH, Essen, Germany) at 323.15 K to remove solvents until 4.5–5.0 mL remained. The nanoemulsions (NE) were prepared using the same procedure but without including chitosan. Unloaded (UN) nanocapsules were prepared by replacing the same amount of BC-AST solution with Ac:EtOH (50:50). The unloaded nanoemulsion (UN-NE) was prepared without BC-AST and chitosan. The Table 6.1 shows the conditions of preparation of the nanoformulations of BC-AST in blue crab and commercial chitosan matrix.

Table 6.1 - Preparation conditions of astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste nanoformulations in blue crab and commercial chitosan matrix.

Sample <sup>1</sup>	BC-AST final concentration (mg/mL)	Blue crab chitosan (BC) concentration (mg/mL)	Commercial chitosan (C) concentration (mg/mL)
BC-NCH0.5	0.5	0.50	-
BC-NCL0.5	0.5	0.25	-
BC-NE0.5	0.5	-	-
BC-NCH1.0	1.0	0.50	-
BC-NCL1.0	1.0	0.25	-
BC-NE1.0	1.0	-	-
BC-NCH2.0	2.0	0.50	-
BC-NCL2.0	2.0	0.25	-
BC-NE2.0	2.0	-	-
C-NCH2.0	2.0	-	0.50
UN-BC-NCH	-	0.50	-
UN-BC-NCL	-	0.25	-
UN-C-NCH	-	-	0.50
UN-NE	-	-	-

<sup>1</sup>BC - nanocapsules in chitosan polymer matrix of the blue crab residue (except for nanoemulsions - NE); C - nanocapsules in polymeric matrix of commercial chitosan; NCH - nanocapsules with chitosan concentration of 0.50 mg/mL in the initial solution; NCL- nanocapsules with chitosan concentration of 0.25 mg/mL in the initial solution; NE - nanoemulsions; UN - unloaded nanocapsules, without astaxanthin-rich extract.

### 6.2.3.1 Size and zeta potential

The particle size distribution and polydispersity index (PDI) was determined by dynamic light scattering with non-invasive back scattering (DLS-NIBS) with 173° of angle of measurement. Zeta potential was analyzed by mixed laser Doppler velocimetry and phase analysis light scattering (M3-PALS), both methods described by Kaiser et al. (2015). Initially, the samples were diluted 1:100 in Milli-Q water, then placed on Malvern Zetasizer NanoZS equipment (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK), equipped with diode laser ( $\lambda = 632.8$  nm), and measured its particle size distribution and the Zeta potential. The readings were performed in triplicate for each sample.

### 6.2.3.2 Encapsulation efficiency

UV-Vis spectra (wavelength: 200-600 nm) and encapsulation efficiency (EE%) of BC-AST were determined through spectrophotometric method. For the EE%, initially 1 mL of hexane was added to 300  $\mu$ L of nanocapsules solution, the sample was centrifuged for 1 h at 16,000 rpm and 288.15 K. An aliquot of the supernatant was removed and the amount of non-encapsulated astaxanthin was measured in spectrophotometer according to item 6.2.1.1. The encapsulation efficiency was calculated according the Equation 6.4.

$$EE\% = \frac{AST_t - AST_s}{AST_t} \times 100 \quad (6.4)$$

in which,  $AST_t$  is the total amount of astaxanthin incorporated in the formulation and;  $AST_s$  is the amount of astaxanthin in supernatant (non-encapsulated astaxanthin).

## 6.2.4 Cytotoxicity

### 6.2.4.1 Cell culture

Cell culture was performed according Kaiser et al. (2015). Briefly, Mandin Darby Canine Kidney (MDCK) cells clone C7<sup>33</sup> were cultured in 75 cm<sup>2</sup> flasks using culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine (200 mM) and 1% penicillin-streptomycin (10,000 units of penicillin, 10,000 units of streptomycin in 0.9% NaCl). Cultures were maintained in humid atmosphere at 310.15 K with 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo MCO-19AIC, Netherlands). After reaching microscopic confluence, the cells were washed with 10 mL of phosphate buffered saline (PBS) and subjected to 10 mL of trypsin/EDTA solution (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA). After, the cells were detached, 10 mL of culture medium was added to the trypsin buffer. The suspension was centrifuged at 1000 rpm for 5 min (Routine 420 R, Hettich GmbH, Tuttlingen, Germany). Excess medium was removed, and the cell pellet was resuspended in 1 mL of culture medium. 10  $\mu$ L aliquot of the cell suspension was diluted into 90  $\mu$ L of trypan blue and the number of cells counted in a Neubauer Chamber prior to inoculation. Cells were split at a ratio of 1:10.

### 6.2.4.2 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Cytotoxicity of the nanoformulations and their compounds was determined by MTT method according to Denizot and Lang (1986). Initially, 100  $\mu\text{L}$  of suspension cells, cultured according to Item 6.2.4.1, were transferred to each of the 96 wells of the cell culture dish (approximately  $10^4$  cells/well or  $10^5$  cells/mL) and incubated for 24 h to attach the plate wall. After 24 h, the cells were washed twice with modified Eagle's medium (MEM), then 100  $\mu\text{L}$  of samples were added and incubated for 3 h at 298.15 K. Samples were removed and the wells were filled with 100  $\mu\text{L}$  of MEM and 25  $\mu\text{L}$  of MTT solution, prepared in phosphate buffered saline (PBS) at 5 mg/mL of tetrazolium blue thiazolyl bromide. After 4 h the medium was again removed and 100  $\mu\text{L}$  of DMSO (dimethylsulfoxide) was added for dilution of the blue dye. Finally, the plates were placed on an orbital shaker at 300 rpm for 15 min and the absorbance was measured on a microplate reader (Safire, Tecan AG, Salzburg, Austria) at  $\lambda = 570$  nm. Cell viability values were calculated according to Equation 6.3:

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{V_n}{V_{cn}} \quad (6.3)$$

in which,  $V_n$  is the cell viability of cells in the presence of nanoformulations; and  $V_{cn}$  is the mean cell viability of the negative control.

BC-AST at concentrations: 0.01, 0.02., 0.05, 0.10, 0.50, 0.70, 1.00, 1.50, 2.00 mg/mL, and nanocapsules (with blue crab and commercial chitosan), at concentrations of BC-AST: 0.01, 0.02., 0.05, 0.10, 0.20 mg/mL were diluted in MEM. Unloaded nanocapsules was tested at 0.2 mg/mL concentration. As a positive control, the Triton-X solution (4% w/v) diluted in PBS was used and 100  $\mu\text{L}$  of MEM was used as the negative control. Each concentration was tested in independent triplicates on different days. Nanocapsules and BC-AST concentrations for the MTT assay were determined from the evaluation of the compounds stability in the cell culture. The stability was evaluated by determination of size, polydispersity and zeta potential as a function of time (zero, 90, 240, 480 and 1440 min).

## 6.2.5 Statistical analyses

Results were statistically evaluated through one-way analysis of variance (ANOVA) using statistical software (Statistica 7, Statsoft Inc., USA). Statistical differences ( $p < 0.05$ ) were analyzed through Tukey's test.

## 6.3 RESULTS AND DISCUSSION

### 6.3.1 Raw material characterization

#### 6.3.1.1 BC-AST

The quantification of astaxanthin (AST) and lipid fraction from the BC-AST (blue crab waste astaxanthin-rich extract) was  $0.8 \pm 0.1$   $\mu\text{gAST}/\text{mg}$  of BC-AST or  $38 \pm 5$   $\mu\text{gAST}/\text{g}_{\text{waste}}$  and lipids total of  $48 \pm 1$   $\text{g}/100\text{g}$  of BC-AST. AST amount in BC-AST was higher than those found by Shahidi e Synowiecki (1991), of  $13.99 \pm 0.20$   $\mu\text{gAST}/\text{g}_{\text{waste}}$  for snow crab (*C. opilio*) waste extract, and shrimp (*P. borealis*) waste extract ( $14.77 \pm 0.25$   $\mu\text{gAST}/\text{g}_{\text{waste}}$ ).

BC-AST has a wide variety of fatty acids. Saturated and unsaturated fatty acids profile of the BC-AST is shown in the Table 6.2. The results indicate that BC-AST contains a high content of monounsaturated and saturated fatty acids, 43% and 40%, respectively, related to BC-AST total lipid content. The fatty acid in the highest amount in the extract is oleic acid ( $\omega$ -9 – 13.29  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), followed by palmitic acid (10.47  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), stearic acid (4.75  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), eicosapentaenoic acid (EPA – 3.58  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), palmitoleic acid (3.36  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), docosahexaenoic acid (DHA – 2.12  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), erucic acid ( $\omega$ -9 – 1.50  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), heptadecenoic acid (1.40  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), myristic acid (1.25  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), linolenic acid ( $\omega$ -6 - 1.03  $\text{g}/100\text{g}$  BC-AST), and other fatty acids have less than 1% of BC-AST each. Çelik et al. (2004) also found the highest value of fatty acid for oleic acid ( $12.9 \pm 0.23\%$  of total fatty acids) and EPA and DHA values, of  $10.6 \pm 0.21$  and  $5.92 \pm 0.05\%$  of total fatty acids, respectively, in the blue crab (*Callinectes sapidus*) claw meat.

Through the fatty acid profile, it is possible to notice that BC-AST has significant amounts of  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 and  $\omega$ -9. The  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 are essential fatty acids, this means that the human body cannot produce it so should be consumed through diet or supplement it. Instead,  $\omega$ -9 is a

conditionally essential fatty acid, so it can be produced by human body from another fatty acid, otherwise it must be consumed or supplemented as well (ASIF, 2011). DHA (docosahexaenoic acid) and EPA (eicosapentaenoic acid) are the two specific  $\omega$ -3 fatty acids found in seafood, especially cold water fish, and their consumption is related to significantly reduced cardiovascular events, as death, nonfatal heart attacks, nonfatal strokes (HARRIS; POSTON; HADDOCK, 2007; KRIS-ETHERTON; HARRIS; APPEL, 2003), can lower triglycerides (GRIMSGAARD et al., 1997), decrease blood pressure (MORRIS; SACKS; ROSNER, 1993).

Results of the present study revealed a  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 fatty acids ratio of 3.7 for BC-AST, this value is higher than that found by Mezzomo et al. (2012) for extracts from *P. brasiliensis* and *P. paulensis* residue obtained by Soxhlet with ethanol, where the  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 fatty acids ratio was 0.15. According to FAO/WHO (1994) points to a  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio in the human diet between 5 and 10 for health maintenance, which allows the use of BC-AST combined with other natural sources of fatty acids to maintain the recommended  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio.



Table 6.2 - Fatty acids profile of the astaxanthin and fatty acids rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste.

Fatty acid	Composition (g/100g <sub>extract</sub> )
Lauric acid (C12:0)	0.05
Myristic acid (C14:0)	1.25
Myristoleic acid (C14:1)	0.08
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.52
Pentadecanoic acid (C15:1)	0.38
Palmitic acid (C16:0)	10.47
Palmitoleic acid (C16:1)	3.36
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.98
Heptadecenoic acid (C17:1)	1.40
Stearic acid (C18:0)	4.75
Oleic acid (C18:1 <i>n</i> -9 <i>cis</i> ) ω-9	13.29
Elaidic acid (C18:1 <i>n</i> -9 <i>trans</i> )	0.29
Linoleic acid (C18:2 <i>n</i> -6 <i>cis</i> ) ω-6	1.03
Linoleic acid C18:2 <i>n</i> -6 <i>trans</i>	0.19
Linolenic acid (C18:3 <i>n</i> -3 <i>cis</i> ) ω-3	0.45
Linolenic acid (C18:3 <i>n</i> -6 <i>cis</i> ) ω-6	< 0.5
Eicosenoic acid (C20:1)	0.06
Eicosadienoic acid (C20:2)	0.06
Eicosatrienoic acid (C20:3 <i>n</i> -6 <i>cis</i> ) ω-6	0.05
Eicosapentaenoic acid (C20:5 <i>n</i> -3 <i>cis</i> - EPA) ω-3	3.58
Heneicosanoic acid (C21:0)	0.69
Erucic acid (C22:1 <i>n</i> -9 <i>cis</i> ) ω-9	1.50
Docosatetraenoic acid (C22:4 <i>n</i> -6) ω-6	0.45
Docosahexaenoic acid (C22:6 <i>n</i> -3 <i>cis</i> - DHA) ω-3	2.12
Tricosanoic acid (C23:0)	0.10
Nervonic acid (C24:1)	0.05
∑ SAFA <sup>1</sup>	18.81
∑ MUFA <sup>2</sup>	20.41
∑ PUFA <sup>3</sup>	7.87

<sup>1</sup> SAFA: saturated fatty acids; <sup>2</sup> MUFA: monounsaturated fatty acids; <sup>3</sup> PUFA: polyunsaturated fatty acids.

### 6.3.1.2 Chitosan

Chitosan is the fully or partially *N*-deacetylated form from chitin, with a typical DA of less than 0.35 or more than 0.65 of deacetylation degree (DD), where  $DD = 1 - DA$  (DONG et al., 2002; PILLAI; PAUL; SHARMA, 2009). Similar values of deacetylation degree were found to blue crab and commercial chitosan, respectively, of 67% and 66%.

Viscosity average molecular weight ( $\overline{M}_v$ ) for the blue crab chitosan and for the commercial chitosan were 7.0 kDa and 41.0 kDa, respectively. This result indicates that blue crab chitosan presents low degree of polymerization and commercial chitosan a high degree of polymerization.

Both the degree of acetylation and the molecular weight causes the chitosan to possess different properties and applications (ELIEH-ALI-KOMI; HAMBLIN, 2016; GOYCOOLEA et al., 2000). Due to its crystalline structure, high molecular weight chitosan has low solubility in aqueous media limiting its use in the pharmaceutical and food industry (KIM et al., 2003), furthermore can increase particle diameter or even aggregation in encapsulation process (ZHANG et al., 2012).

Luangtana-anan et al. (2005) observed that low molecular weight chitosan (35 kDa) formed smaller capsules, size of  $217 \pm 6$  nm, in comparison to medium and high molecular weight chitosan (100 and 800 kDa, size of  $977 \pm 47$  and  $1957 \pm 167$ , respectively) in a study of bovine serum albumin (1.0 mg/mL) encapsulation, however the encapsulation efficiency did not differ for nanoparticles prepared with the chitosan base within the different molecular weight range.

### 6.3.2 Nanoformulations

The results of size, PDI, zeta potential (day 0 and after 30 days), and encapsulation efficiency of the nanoformulations are shown in Table 6.3. The average size of each formulation ranged from ~122 to ~447 nm, this shows that the method used and raw materials are effective in forming small particles at nanoscale (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). As well as the results obtained by Kaiser et al. (2015) in nanoformulations of chitosan-coated nanocapsules and nanoemulsions with and without capsaicin (10 mM), unloaded formulations presented smaller sizes than those with the presence of the bioactive compound. The smaller particles were formed with lower concentrations of BC-AST, in the samples BC-NCL0.5 ( $209 \pm 4$  nm) BC-NCH0.5 ( $225 \pm 5$  nm), BC-NCH1.0 ( $223 \pm 6$  nm). From the

concentration of 1.0 mg/mL of BC-AST, the nanocapsules prepared with the highest concentration of chitosan (0.50 mg/mL) formed smaller particles than nanocapsules with lower chitosan concentration (0.25 mg/mL), indicating that the increasing concentration of chitosan in solution may not have been sufficient to cover the surface of the nanoemulsion. The largest size of nanocapsules was found for capsules prepared with commercial chitosan, C-NCH2.0 sample, of  $385 \pm 16$  nm. In capsules formed with the blue crab chitosan, the largest size was found for BC-NCL2.0, of  $284 \pm 12$  nm.

Polydispersity index (PDI), which provides information on the homogeneity of the size distribution, was below 0.31 for all the nanoformulations obtained, indicating the formation of monodisperse and non-aggregated systems. Polydispersity indexes less than 0.2 are ideal as they indicate that the particle size distribution falls within a narrow range of sizes (MORAES et al., 2010).

Mohd Affandi, Julianto and Majeed (2011) found similar values of size and PDI,  $123 \pm 1$  nm and  $0.13 \pm 0.01$ , respectively, for nanoemulsion prepared with astaxanthin emulsion (oil extract containing 10% w/w of standardized astaxanthin), Tween 80 and lecithin as the emulsifiers and applying high speed of rotation (9000 rpm) and high pressure (80 MPa) in the preparation of the nanoemulsion. They have noted that the drug content and particle size of the nanoemulsion remained stable at different temperatures (278.15; 298.15 and 313.15 K) over a period of 3 months.

Nanoparticles with a zeta potential  $\geq (\pm) 30$  are more stable in suspension, as the surface charge prevents aggregation of the particles. (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Nanocapsules with BC-AST chitosan-coated had a strongly positive zeta potential, between +53 mV (UN-BC-NCL) and +80 mV (C-NCH2.0). Nanoemulsions showed negative zeta potential values. Positively charged colloidal bioactive compounds formulations have shown interesting properties when compared to the negatively charged systems: they have improved stability in the presence of biological cations and their interaction with negatively charged biological membranes is facilitated (CALVO et al., 1997).

High encapsulation efficiency (above 94%) was found for all conditions of concentrations tested, with no significant difference. Kittikaiwan et al. (2007) found similar values (~99%) in the encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. Higuera-Ciapara et al. (2004) obtained 92% of encapsulation efficiency in the microencapsulation of commercial

astaxanthin in a chitosan (from shrimp) matrix using multiple emulsion/solvent evaporation technique.

Table 6.3 - Physicochemical properties of nanoencapsulates and nanoemulsions with or without astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste in blue crab and commercial chitosan polymeric matrix.

Nanoformulations	Size (nm) <sup>1</sup>	PDI <sup>1</sup>	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%) <sup>1</sup>
	0 day			
BC-NCH0.5	225 ± 5 <sup>h</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>fg</sup>	+70 ± 3	97 ± 1 <sup>a</sup>
BC-NCL0.5	209 ± 4 <sup>hi</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>h</sup>	+65 ± 1	94 ± 6 <sup>a</sup>
BC-NE0.5	130 ± 4 <sup>mn</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>jk</sup>	-21 ± 4	-
BC-NCH1.0	223 ± 6 <sup>h</sup>	0.25 ± 0.01 <sup>cdef</sup>	+67 ± 2	98.96 ± 0.01 <sup>a</sup>
BC-NCL1.0	254 ± 6 <sup>g</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>cdef</sup>	+59 ± 3	96.19 ± 0.02 <sup>a</sup>
BC-NE1.0	129 ± 3 <sup>mn</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>jk</sup>	-24 ± 2	-
BC-NCH2.0	257 ± 18 <sup>fg</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>bcd</sup>	+68 ± 2	99.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
BC-NCL2.0	284 ± 12 <sup>de</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>abc</sup>	+61 ± 2	98.3 ± 0.2 <sup>a</sup>
BC-NE2.0	153 ± 11 <sup>kl</sup>	0.10 ± 0.02 <sup>k</sup>	-20 ± 3	-
C-NCH2.0	385 ± 16 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>ab</sup>	+80 ± 1	99.0 ± 0.1 <sup>a</sup>
UN-BC-NCH	185 ± 4 <sup>j</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>gh</sup>	+63 ± 1	-
UN-BC-NCL	171 ± 3 <sup>jk</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>ij</sup>	+53 ± 4	-
UN-C-NCH	285 ± 19 <sup>de</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>bc</sup>	+76 ± 2	-
UN-NE	136 ± 11 <sup>lmn</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>ijk</sup>	-28 ± 2	-
30 days				
BC-NCH0.5	213 ± 3 <sup>h</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>def</sup>	+73 ± 3	-
BC-NCL0.5	230 ± 34 <sup>h</sup>	0.23 ± 0.02 <sup>efg</sup>	+71 ± 2	-
BC-NE0.5	122 ± 3 <sup>n</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>jk</sup>	-30 ± 2	-
BC-NCH1.0	215 ± 8 <sup>h</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>cdef</sup>	+77 ± 2	-
BC-NCL1.0	264 ± 10 <sup>efg</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>cdef</sup>	+75 ± 2	-
BC-NE1.0	124 ± 3 <sup>n</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>jk</sup>	-25 ± 1	-
BC-NCH2.0	280 ± 12 <sup>def</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>abc</sup>	+78 ± 1	-
BC-NCL2.0	312 ± 15 <sup>c</sup>	0.27 ± 0.02 <sup>cde</sup>	+75 ± 1	-
BC-NE2.0	149 ± 13 <sup>lm</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>jk</sup>	-26 ± 1	-
C-NCH2.0	447 ± 25 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>bc</sup>	+78 ± 2	-
UN-BC-NCH	191 ± 3 <sup>ij</sup>	0.26 ± 0.02 <sup>cdef</sup>	+74 ± 2	-
UN-BC-NCL	178 ± 2 <sup>j</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>hi</sup>	+66 ± 1	-
UN-C-NCH	300 ± 15 <sup>cd</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>a</sup>	+73 ± 6	-

UN-NE

- - - -

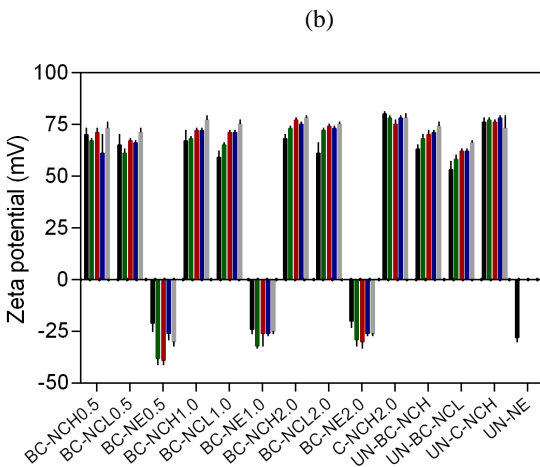
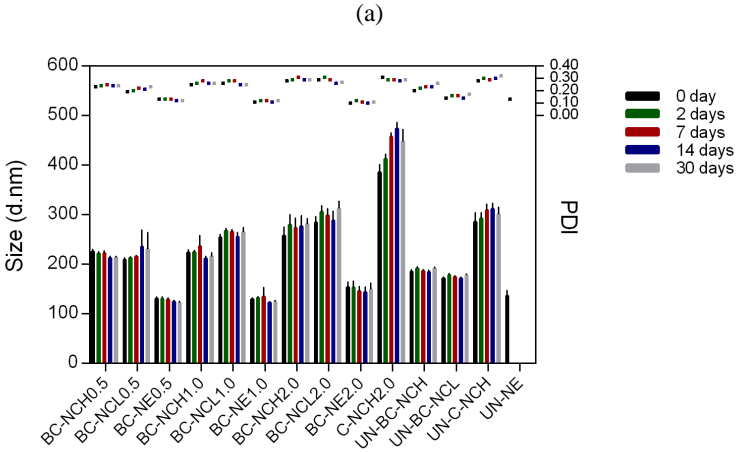
---

<sup>1</sup>Same letter in same column indicates no statistical difference ( $p < 0.05$ ).

Nanoformulations stability was evaluated according to particle size, PDI and zeta potential for 30 days. The results are shown in Figure 6.1. From Figure 6.1 (a) and Table 6.3 it is possible to evaluate that, except for the samples BC-NCL2.0 (blue crab chitosan) and C-NCH2.0 (commercial chitosan), the nanoformulations did not have significant change in size in 30 days and apparently it is not possible to notice the formation of aggregates. The nanocapsules with commercial chitosan besides having the larger sizes presented greater instability than the nanocapsules elaborated with blue crab chitosan. Nanoemulsion (without chitosan-coated) and unloaded nanocapsules (without BC-AST) present significantly smaller sizes than nanocapsules with BC-AST, this behavior was also reported by Kaiser et al. (2015). Comparing the samples UN-BC-NCH(L) and nanoemulsions (NE) with the BC-AST nanocapsules, it is noted that the junction of chitosan and BC-AST is responsible for the increase of nanocapsules.

Zeta potential values (Figure 6.1 (b) and Table 6.3) confirm that nanoformulations maintain good stability for 30 days. Due to the compounds intrinsic characteristics, lecithin and astaxanthin nanoemulsion have negative values of zeta potencial (MEOR MOHD AFFANDI; JULIANTO; MAJEED, 2011). Since the potential zeta value of chitosan is positive (GOYCOOLEA et al., 2012), the fact that the nanocapsules present positive values indicates that the nanoemulsion is properly encapsulated.

Figure 6.1- (a) Size and polydispersity index (PDI) and (b) zeta potential of the nanocapsulates of the astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) at different concentrations 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL in blue crab (BC-NC) and commercial (C-NC) chitosan polymeric matrix, nanoemulsions (NE) and unloaded (UN) nanocapsules.

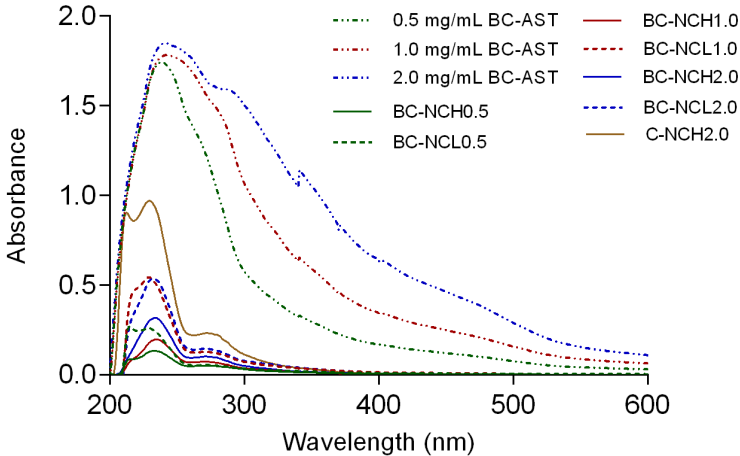


It is possible to notice in UV-Vis spectral profile (200 – 600 nm) from Figure 6.2 that the absorbance peak at ~480 nm, characteristic of astaxanthin, increase with the increase of the concentration of BC-AST in the solution, from 0.5 to 2.0 mg/mL.

BC-AST peaks between 200 - 450 nm indicate the presence of other compounds. Organic solvent sohxlet technique used in BC-AST extraction is not selective, thus allowing the extraction of other compounds besides astaxanthin. Absorption band at 262 nm and 280 nm are characteristic of the presence of protein and chitin, respectively (STOSCHECK, 1990; UZUN; ÇELİK, 2015). Therefore, the UV-Vis spectrum confirms the presence of other compounds in extract that can act in synergism with astaxanthin presenting the interesting bioactive properties of BC-AST (Chapter 5 of this document).

In Uv-Vis spectrum curves of BC-NC and C-NC, solutions resulting from the washing of nanocapsules with hexane, the astaxanthin peak (~480 nm) is not visible (near zero), indicating that most of astaxanthin was encapsulated, confirming the high EE% presented in the Table 6.3. Peaks between 200 and 260 nm are representative of chitin, chitosan and their monomers, while peak at 280 nm indicates the presence of proteins and non-encapsulated compounds (RHAZI et al., 2002; STOSCHECK, 1990; UZUN; ÇELİK, 2015). Nanocapsules formulated with commercial chitosan (C-NCH2.0) exhibit the highest absorbance peak between 200 and 300 nm, indicating lower encapsulation efficiency of the BC-AST compounds, compared with the nanocapsules with blue crab chitosan. Nanocapsules formulated with higher concentration of blue crab chitosan (BC-NCH), presented smaller peaks, in 200-300 nm, in relation to the formulations with lower concentration of blue crab chitosan (BC-NCL).

Figure 6.2 - UV-Vis spectra (200–600 nm) of the astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) waste (BC-AST) at different concentrations 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL and the hexane supernatant of the nanoencapsulates with different concentrations of astaxanthin extract in blue crab (BC-NCH and BC-NCL) and commercial (C-NCH) chitosan polymeric matrix.



### 6.3.4 Cytotoxicity

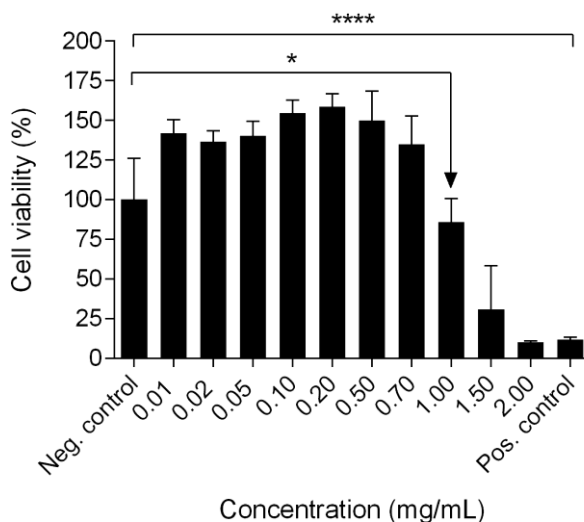
There are few studies on cytotoxicity of multicomponent extracts, such as plant and animal extracts, on healthy cells. These studies are important to aid the dose specification to produce safe foods, medicines and supplements. Cell viability (MTT assay) of MDCK cells treated with BC-AST with different concentrations is shown in Figure 6.3. MDCK cells viability decreased at 46, 84, 94% in presence of BC-ASTA (considering the concentration 0.20 mg/mL as 100%) in concentrations of 1.00, 1.50, 2.00 mg/mL, respectively. Considering that the extract is multicomponent and the lack of bibliographic references, it is not possible to determine which is the main factor/compound responsible for the decreased cell viability. Macedo et al. (2010) also found that the neutrophils viability was decreased by 15, 70, 88, and 92% with commercial astaxanthin at 10, 20, 30 and 40  $\mu$ M, respectively, which suggests that astaxanthin can be the agent responsible for cell viability decrease. Already Liu and Osawa (2009) reported that commercial astaxanthin did not have apparent effect on cell viability at a concentration of 25–1,000 nM even for 24 h.



From concentration of 0.01 to 0.70 mg/mL of BC-AST cell viability was increased compared to negative control. Maximum increase of the cell viability was at 0.20 mg/mL (58%), therefore, this concentration was used for later studies in cell viability. This same behavior, was observed by Santos et al. (2012) in standard astaxanthin and shrimp (*L. vannamei*) waste extract in rat alveolar macrophages. Jang et al. (2010) also showed that astaxanthin at 500  $\mu$ M increased cell viability (MTT assay) in a dose-dependent manner on bovine oviduct epithelial cell. These facts prove that BC-AST has the capacity to promote cell growth. The data found in this study can be used as a basis for further studies on the astaxanthin-rich extracts in tissue growth.

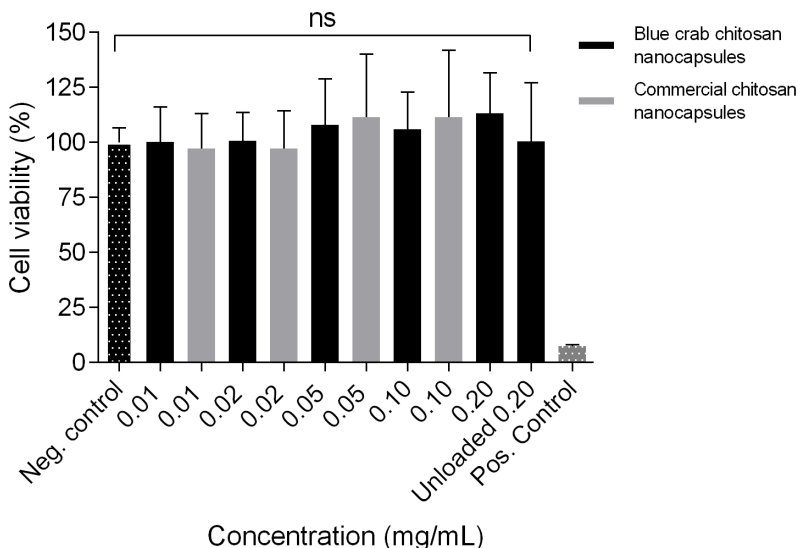
Astaxanthin demonstrated stimulate collagen fibers boosting wrinkle reduction, by protecting the dermal layer from singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) damage, in a study developed by Tominaga et al. (2010) using human dermal fibroblasts. According to Tominaga (2012) astaxanthin can improve the skin condition in all layers such as corneocyte layer, epidermis, basal layer and dermis by combining both oral supplementation and topical treatment.

Figure 6.3 - Cell viability (%) of MDCK cells treated with the astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) in different concentrations (mg/mL). The columns are mean values  $\pm$  SD. Statistical test: one-way ANOVA (\*  $p = 0.0213$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ); Negative control vs. other values.



The influence of nanomaterials on cell viability depends on the physical and chemical parameters of particles such as, size, charge, morphology and chemical composition, and the exposure conditions as, cell type and density, particle concentration, medium composition, temperature, and exposure time (SANTOS-CARBALLAL et al., 2015). The results of the cytotoxicity investigation of BC-AST nanocapsules in blue crab and commercial chitosan polymeric matrix at different concentrations are presented in Figure 6.4. It is possible to observe that all the concentrations of BC-AST nanocapsules and unloaded nanocapsule (just blue crab chitosan-coat) did not significantly reduce cell viability compared to negative control. Different of the results found for non-encapsulated BC-AST, there was no significant increase in cell viability to BC-AST encapsulated with blue crab and commercial chitosan compared to negative control. This indicates that the chitosan-coated nanocapsules may attenuate the effect of BC-AST on cell viability. Therefore, it is possible that higher concentrations of BC-AST are non-toxic when encapsulated with chitosan, this effect of toxicity modulate was observed by Kaiser et al. (2015) in a study of encapsulated (with chitosan-coat) and non-encapsulated capsaicin, where, concentrations of 500  $\mu\text{M}$  of free capsaicin demonstrated high toxicity to MDCK-C7 cells, whereas the capsaicin presented no toxicity when encapsulated with chitosan.

Figure 6.4 - Cell viability (%) of the MDCK cells treated with nanoencapsulates with different concentrations of astaxanthin-rich extract from blue crab (*Callinectes sapidus*) in blue crab (black columns) and commercial (grey columns) chitosan polymeric matrix. The columns are mean values  $\pm$  SD. Statistical test: one-way ANOVA (ns - no significant difference).



## 6.4 CONCLUSIONS

It is possible to extract compounds of commercial interest from the blue crab (*Callinectes sapidus*) waste. From the depigmentation of this waste it is possible to obtain an astaxanthin and fatty acids-rich extract (including omega 3, 6 and 9). And from the depigmented residue it is possible to carry out chitin deacetylation and to obtain chitosan of low degree of polymerization. In encapsulation of the astaxanthin and fatty acid-rich extract in blue crab chitosan polymer matrix, was obtained nanocapsules with size of 209 to 284 nm and encapsulation efficiency of approximately 99%. Nanocapsules were stable for a period of 30 days, considering parameters such as size, PDI and zeta potential.

In cytotoxicity assays, the cells viability in MCDK decreased at 46, 84, 94% in presence of astaxanthin and fatty acids extract (considering the concentration 0.20 mg/mL as 100%) in concentrations of 1.00, 1.50, 2.00 mg/mL, respectively. In contrast, the extract

encapsulated in chitosan did not increase or decrease the cell viability of MDCK cells at the studied concentrations.

Cell viability of blue crab waste extract in concentrations of 0.01 to 0.70 mg/mL was increased compared to negative control. This result had not been published previously. This promising result suggest further studies about application of blue crab waste extract in tissue growth. Results from this exclusive work suggest better use for the biowaste blue crab residue, which may represent a social and environmental benefits.

## CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo indicam que é viável obter compostos de importância tecnológica, como hidrolisados proteicos, quitina e extrato rico em astaxantina do resíduo de processamento de siri-azul (*Callinectes sapidus*).

A partir dos estudos de pré-tratamento enzimático da matéria-prima, concluiu-se que a hidrólise proteica do resíduo de siri-azul utilizando alcalase 3% (E/S) obteve o melhor grau de hidrólise, resultando em aproximadamente 30% do material proteico após 120 minutos de reação e, a fração proteica solúvel encontrada foi, aproximadamente, 3,5 vezes maior que a fração solúvel sem a presença de enzimas. A enzima bromelina apresentou baixa eficiência de grau de hidrólise para as concentrações estudadas de 1% e 3% (E/S).

Os extratos carotenoidicos obtidos da fração insolúvel da hidrólise enzimática apresentaram alta atividade antioxidante quando comparados com astaxantina comercial e BHT.

As análises de FTIR, TG e SEM das quitinas obtidas a partir da hidrólise enzimática do resíduo apresentaram características semelhantes às relatadas na literatura. Também foi possível avaliar que o tratamento enzimático não alterou drasticamente a estrutura das quitinas obtidas.

Com o estudo das técnicas de extração de carotenoides do resíduo de siri-azul foi possível concluir que o produto obtido (extrato) é dependente da escolha do método de extração e do solvente utilizado. Os extratos obtidos pela técnica a baixa pressão com Soxhlet apresentaram os maiores rendimentos de extração global, maior eficiência na recuperação de astaxantina e melhores atividades antioxidantes. É provável que o aquecimento do solvente durante a extração seja o principal responsável por esses resultados. Embora o etanol seja o solvente com maior capacidade de extração de astaxantina, pode-se notar que os extratos obtidos com acetona apresentam maiores atividades antioxidantes. Os testes realizados utilizando a mistura dos solventes, etanol e acetona, mostraram-se eficientes na obtenção de extratos com características otimizadas comparadas às obtidas com a utilização do solvente puro

A extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (SFE), para todos os parâmetros avaliados, apresentou valores menores quando comparados aos extratos obtidos por métodos convencionais (LPE). No entanto, a SFE utilizando 4% de acetona como cossolvente apresentou baixo rendimento global, mas resultado satisfatório de atividade antioxidante, indicando que este

método e solvente podem ser utilizados na extração de extratos concentrados, utilizando menor quantidade de solvente orgânico.

Após a recuperação de astaxantina, é possível obter quitosana a partir dos resíduos despigmentados de siri-azul. Os diferentes métodos de despigmentação utilizados não apresentaram diferenças significativas na estrutura das quitosanas obtidas.

No estudo de nanoencapsulamento do extrato rico em astaxantina em matriz polimérica de quitosana, ambos obtidos do resíduo de siri-azul, foram formadas nanocápsulas com tamanho de 209 a 284 nm e eficiência de encapsulamento de aproximadamente 99%. As nanocápsulas obtidas foram estáveis por um período de 30 dias, considerando parâmetros como tamanho, PDI e potencial zeta.

Nos testes de citotoxicidade, a viabilidade celular de MCDK diminuiu 46, 84, 94% na presença do extrato de resíduo de siri-azul (considerando a concentração de 0,20 mg/mL como 100%) nas concentrações de 1,00; 1,50 e 2,00 mg/mL, respectivamente. Porém, o extrato nanoencapsulado não alterou a viabilidade celular das células MDCK nas concentrações estudadas.

A viabilidade celular do extrato nas concentrações de 0,01 a 0,70 mg/mL foi maior em comparação ao controle negativo, o que sugere que o extrato de resíduo de siri-azul, nessas concentrações, pode apresentar características de regeneração de tecidos. Este resultado não foi publicado anteriormente. Sendo assim, mais estudos devem ser desenvolvidos nessa área com objetivo de identificar os compostos e avaliar a aplicabilidade do extrato em tratamentos medicinais.

Por fim, é possível concluir, a partir dos resultados que constam neste documento, que este estudo apresenta resultados inéditos e promissores. O resíduo de siri-azul possui um grande potencial como matéria-prima para a obtenção de compostos bioativos que podem ser utilizados em indústrias de alimentos e bebidas, alimentos para animais, farmacêuticas, cosméticos, entre outras. Assim, é possível agregar valor a um material pouco utilizado atualmente, trazendo benefícios socioambientais.

## 7.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Utilizar diferentes enzimas proteases na obtenção do hidrolisado proteico obtido do resíduo de siri-azul e determinar o perfil de aminoácidos;
- b) Realizar a extração dos compostos bioativos do resíduo de siri-azul utilizando outras técnicas, como água subcrítica e extração assistida por micro-ondas;
- c) Avaliar a atividade antioxidante dos extratos ricos em astaxantina de resíduo de siri-azul por metodologias *in vivo*;
- d) Testar as atividades biológicas da quitosana obtida do resíduo de siri-azul;
- e) Realizar estudos de estabilidade do extrato de resíduo de siri-azul nanoencapsulado;
- f) Testar atividades biológicas, como propriedades anti-inflamatória e antitumoral, das nanocápsulas obtidas a partir do extrato rico em astaxantina e quitosana;
- g) Realizar testes de liberação controlada das nanocápsulas com compostos extraídos do resíduo de siri-azul em diferentes meios simulantes;
- h) Avaliar a capacidade de regeneração celular *in vivo* do extrato de resíduo de siri-azul.





## REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1996.
- A.O.A.C. **Official Methods of the AOAC International**. 18. ed. Maryland: American Oil Chemists Society, 2005.
- A.O.C.S. **Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society**. [s.l.] American Oil Chemists Society, 2002.
- ABDEL-RAHMAN, R. M. et al. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 107–120, set. 2015.
- ALESCI, A. et al. Production and extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* and its biological effect on alcohol-induced renal hypoxia in *Carassius auratus*. **Natural Product Research**, v. 29, n. 12, p. 1122–1126, jun. 2015.
- AMORIM-CARRILHO, K. T. et al. Review of methods for analysis of carotenoids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 56, p. 49–73, abr. 2014.
- ANAL, A. K.; NOOMHORM, A.; VONGSAWASDI, P. Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides from Seafood and Crustacean Waste: Their Extraction, Bioactive Properties and Industrial Perspectives. In: **Marine Proteins and Peptides**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 709–735.
- ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544–552, jan. 2012.
- ANGUS, S.; B, A.; DE REUCK, K. M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State: Carbon Dioxide**. Oxford: Pergamon Press, 1976.
- ANTONINO, N. DE A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2007.
- ANTUNES-VALCAREGGI, S. A.; FERREIRA, S. R. S.; HENSE, H. Enzymatic Hydrolysis of Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) Waste Processing to Obtain Chitin, Protein, and Astaxanthin-Enriched Extract. **International**

**Journal of Environmental & Agriculture Research**, v. 3, n. 1, 2017.

**AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. Champaign: AOCS Press, 2003.

ARANAZ, I.; ACOSTA, N.; HERAS, A. Encapsulation of an Agrobacterium radiobacter extract containing d-hydantoinase and d-carbamoylase activities into alginate–chitosan polyelectrolyte complexes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1–4, p. 54–64, jun. 2009.

ASIF, M. Health effects of omega-3,6,9 fatty acids: *Perilla frutescens* is a good example of plant oils. **Oriental Pharmacy & Experimental Medicine**, v. 11, n. 1, p. 51–59, 4 mar. 2011.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. v. 3, p. 27–34, 2007.

AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 3, 2015.

BABU, C. M.; CHAKRABARTI, R.; SAMBASIVARAO, K. R. S. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 227–235, mar. 2008.

BASTOS, D. DA S. et al. Microencapsulation of cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) juice using a new chitosan–commercial bovine whey protein isolate system in spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 683–692, out. 2012.

BATAILLE, M. P.; BATAILLE, P. F. Extraction of proteins from shrimp processing waste. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 203–208, 16 abr. 2008.

BATES, C. et al. Plasma essential fatty acids in pure and mixed race American Indians on and off a diet exceptionally rich in salmon. **Prostaglandins, leukotrienes, and medicine**, v. 17, n. 1, p. 77–84, jan. 1985.

BENELLI, P. et al. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132–141, nov. 2010.

BERNSTEIN, P. S. et al. The value of measurement of macular carotenoid pigment optical densities and distributions in age-related macular

degeneration and other retinal disorders. **Vision Research**, v. 50, n. 7, p. 716–728, mar. 2010.

BERTRAM, J. S.; VINE, A. L. Cancer prevention by retinoids and carotenoids: Independent action on a common target. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 170–178, maio 2005.

BEYKI, M. et al. Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 310–319, mar. 2014.

BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, n. 1, p. 67–75, jan. 2005.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, ago. 1959.

BRANCA, C. et al. Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. **Polymer**, v. 99, p. 614–622, set. 2016.

BRÜCK, W.; SLATER, J.; CARNEY, B. Chitin and Chitosan from Marine Organisms. In: KIM, S. K. (Ed.). . **Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives**. New York: CRC Press, 2010. p. 11–23.

BRUGNEROTTO, J. et al. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, abr. 2001a.

BRUGNEROTTO, J. et al. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, n. 25, p. 09921–09927, dez. 2001b.

BRUNNER, C. **Gas extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process**. Darmstadt: Steinkopff, 1994.

CAHÚ, T. B. et al. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 570–577, 2012.

CALVO, P. et al. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. **Colloid & Polymer Science**, v. 275, n. 1, p. 46–53, jan. 1997.

CAMPANA-FILHO, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de alfa e beta-quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644–650, jun. 2007.

CAO, J. et al. Curcumin Attenuates Acrylamide-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in HepG2 Cells by ROS Scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 12059–12063, 24 dez. 2008.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, abr. 2010.

ÇELIK, M. et al. Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the north eastern Mediterranean. **Food Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 271–273, nov. 2004.

CHANPHAI, P.; TAJMIR-RIAAHI, H. A. Encapsulation of testosterone by chitosan nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 535–541, maio 2017.

DANDGE, D. K.; HELLER, J. P.; WILSON, K. V. Structure solubility correlations: organic compounds and dense carbon dioxide binary systems. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 24, n. 1, p. 162–166, mar. 1985.

DAVIDOV-PARDO, G.; MCCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, jan. 2015.

DE CAMPOS, L. M. A. S. et al. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413–8420, nov. 2008.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, maio 1986.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, jul. 2005.

DONG, Y. et al. Influence of degree of deacetylation on critical concentration of chitosan/dichloroacetic acid liquid-crystalline solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 83, n. 6, p. 1204–1208, 7 fev. 2002.

DUFOSSE, L.; DE LA BROISE, D.; GUÉRARD, F. **Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite**

**production.** 1. ed. [s.l.] Research Signpost, 1997.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. **International journal of advanced research**, v. 4, n. 3, p. 411–427, 2016.

ESPINOSA-ANDREWS, H. et al. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 3, p. 541–546, fev. 2010.

ESTEVINHO, B. N. et al. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 138–155, 2013.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, out. 2010.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation Techniques for Food Ingredient Systems. In: **Food Materials Science and Engineering**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 320–348.

FANIMO, A. et al. Protein quality of shrimp-waste meal. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 185–188, abr. 2000.

FANKAM, A. G. et al. Cytotoxicity of the extracts and fractions from *Allanblackia gabonensis* (Clusiaceae) towards a panel of cancer cell lines. **South African Journal of Botany**, v. 111, p. 29–36, jul. 2017.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2014.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome: [s.n.].

FAO/WHO. **Fats and oils in human nutrition**. Rome: [s.n.].

FDA. **Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services** United States of America, 2017.

FÉLIX-VALENZUELA, L. et al. Supercritical CO<sub>2</sub>/ethanol extraction of astaxanthin from blue crab (*Callinectes sapidus*) shell waste. **Journal of Food Process Engineering**, v. 24, n. 2, p. 101–112, maio 2001.

FELIX-VALENZUELA, L.; HIGUERA-CIAPARAI, I.; GOYCOOLEA-VALENCIA, F. Supercritical coethanol extraction of astaxanthin from blue crab (*Callinectes sapidus*) shell waste. **Journal of Food Process Engineering**, v. 24, n. 2001, p. 101–112, 2000.

FERREIRO-VERA, C. et al. On-line coupling of automatic solid-phase extraction and HPLC for determination of carotenoids in serum. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 1842–1847, set. 2011.

FRANÇA, L. F. et al. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, n. 3, p. 247–256, mar. 1999.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, n. 1–2, p. 57–63, nov. 1986.

GHORBEL-BELLAJ, O. et al. Shrimp waste fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* A2: optimization of chitin extraction conditions through Plackett-Burman and response surface methodology approaches. **International journal of biological macromolecules**, v. 48, n. 4, p. 596–602, 1 maio 2011.

GIGLIOTTI, J. C.; JACZYNSKI, J.; TOU, J. C. Determination of the nutritional value, protein quality and safety of krill protein concentrate isolated using an isoelectric solubilization/precipitation technique. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 209–214, nov. 2008.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8–9, p. 809–812, mar. 2001.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. **Chitosan Market Size By Application**. [s.l.: s.n.].

GÖKMEN, V. et al. Development of functional bread containing nanoencapsulated omega-3 fatty acids. **Journal of Food Engineering**, v. 105, n. 4, p. 585–591, ago. 2011.

GORTARI, M. C.; HOURS, R. A. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 3, 15 maio 2013.

GOVENDER, T. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 2, p. 171–185, 1 fev. 1999.

GOYCOOLEA, F. M. et al. Chitin and Chitosan. In: DOXASTAKIS, G.; KIOSSEOGLOU, V. (Eds.). **Novel Macromolecules in Food Systems**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Science, 2000. p. 468.

GOYCOOLEA, F. M. et al. Chitosan-based nanocapsules: physical characterization, stability in biological media and capsaicin encapsulation. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 14, p. 1423–1434, 8 set. 2012.

GRAND VIEW RESEARCH. **Astaxanthin Market Report Astaxanthin Market Analysis By Source (Natural [Yeast, Krill/Shrimp, Microalgae] And Synthetic), By Product (Dried Biomass/Powder, Oil, Soft gels, Liquid), By Application, And Segment Forecasts, 2014 - 2025.** Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/global-astaxanthin-market>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

GRIMSGAARD, S. et al. Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 649–659, 1997.

GROSS, G. J.; LOCKWOOD, S. F. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (Cardax). **Life sciences**, v. 75, n. 2, p. 215–24, 28 maio 2004.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210–216, 2003.

GUNATILLAKE, P.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells and Materials**, v. 5, p. 1–16, 1 out. 2003.

HANSEN, M. E.; ILLANES, A. Applications of crustacean wastes in biotechnology. In: MARTIN, A. M. (Ed.). **Fisheries Processing**. Boston, MA: Springer, 1994. p. 174–205.

HARRIS, W. S.; POSTON, W. C.; HADDOCK, C. K. Tissue n<sup>o</sup>3 and n<sup>o</sup>6 fatty acids and risk for coronary heart disease events. **Atherosclerosis**, v. 193, n. 1, p. 1–10, jul. 2007.

HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J. Extraction and recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solids using supercritical fluids. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 1705–1708, jul. 1987.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2495–2511, abr. 2010.

HIGUERA-CIAPARA, I. et al. Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 1, p. 41–45, maio 2004.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 2, p. 185–196, 2006.

HIMONIDES, A. T.; TAYLOR, A. K. D.; MORRIS, A. J. A Study of the Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames Using Model Systems. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, n. 6, p. 575–585, 2011.

HINOSTROZA, G. C. et al. Pigmentation of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with oil-extracted astaxanthin from the langostilla (*Pleuroncodes planipes*). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 47, n. 3, p. 237–241, 1997.

HIRANO, S. et al. Chitin and Chitosan for use as a Novel Biomedical Material. In: **Advances in Biomedical Polymers**. Boston, MA: Springer US, 1987. p. 285–297.

HOLANDA, H. D. DE. **Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

HOLANDA, H. D. DE; NETTO, F. M. Recovery of Components from Shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. C298–C303, jun. 2006.

HOLLENDER, J. et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted soils with binary and ternary supercritical phases. **Journal of Chromatography A**, v. 776, n. 2, p. 233–243, ago. 1997.

HOYLE, N. T.; MERRITT, J. H. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). **Journal of Food Science**, v. 59, n. 1, p. 76–79, jan. 1994.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L.-Y. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 344–353, fev. 2004.

HUSSEIN, G. et al. Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-cp. **Life Sciences**, v. 80, n. 6, p. 522–529, jan. 2007.

IBAMA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília: [s.n.].

ISLAM, M. S.; KHAN, S.; TANAKA, M. Waste loading in shrimp and fish processing effluents: potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 1–2, p. 103–110, jul. 2004.

ISO. **INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO 1443: Meat and meat products - determination of total fat content**. [s.l.: s.n.].



- JAIN, R. A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2475–2490, dez. 2000.
- JANG, H. et al. Antioxidative Effects of Astaxanthin against Nitric Oxide-Induced Oxidative Stress on Cell Viability and Gene Expression in Bovine Oviduct Epithelial Cell and the Developmental Competence of Bovine IVM/IVF Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 967–974, dez. 2010.
- JAYAKUMAR, R. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 227–232, set. 2010.
- JEDDI, M. Z.; KHANIKI, G. J.; SADIGHARA, P. Optimization of extraction of carotenoids from shrimp waste. **Global Veterinaria**, v. 10, n. 6, p. 636–637, 2013.
- JEON, Y.-J.; KIM, S.-K. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 503–507, 2002.
- JO, G. H. et al. Screening of protease-producing *Serratia marcescens* FS-3 and its application to deproteinization of crab shell waste for chitin extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 504–508, nov. 2008.
- JYONOUCHI, H. et al. Antitumor Activity of Astaxanthin and Its Mode of Action. **Nutrition and Cancer**, v. 36, n. 1, p. 59–65, jan. 2000.
- KAILAKU, S. I.; MULYAWANTI, I.; ALAMSYAH, A. N. Formulation of Nanoencapsulated Catechin with Chitosan as Encapsulation Material. **Procedia Chemistry**, v. 9, p. 235–241, 2014.
- KAISER, M. et al. Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10048, 13 set. 2015.
- KANG, H. J. et al. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 614–620, mar. 2006.
- KARAS, M. et al. Lycopene Interferes With Cell Cycle Progression and Insulin-Like Growth Factor I Signaling in Mammary Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 36, n. 1, p. 101–111, jan. 2000.
- KARPPI, J. et al. Serum Carotenoids Reduce Progression of Early Atherosclerosis in the Carotid Artery Wall among Eastern Finnish Men. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64107, 21 maio 2013.

KETNAWA, S.; RAWDKUEN, S.; CHAIWUT, P. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel Nang Lae cultivar. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2–3, p. 205–211, nov. 2010.

KHALILI, S. T. et al. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 502–508, jan. 2015.

KIM, T. H. et al. Galactosylated chitosan/DNA nanoparticles prepared using water-soluble chitosan as a gene carrier. **Biomaterials**, v. 25, n. 17, p. 3783–3792, ago. 2003.

KITTIKAIWAN, P. et al. Encapsulation of *Haematococcus pluvialis* using chitosan for astaxanthin stability enhancement. **Carbohydrate Polymers**, v. 70, n. 4, p. 378–385, nov. 2007.

KLOMPONG, V. et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1317–1327, jan. 2007.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HARRIS, W. S.; APPEL, L. J. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: New Recommendations From the American Heart Association. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 151–152, 1 fev. 2003.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 1, p. 43–81, jan. 2000.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications q. v. 46, p. 1–27, 2000.

KUMIRSKA, J. et al. Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1567–1636, 29 abr. 2010.

KURASHIGE, M. et al. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. **Physiological chemistry and physics and medical NMR**, v. 22, n. 1, p. 27–38, 1990.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1921–1971, nov. 2001.

LADEMANN, J. et al. Carotenoids in human skin. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 377–382, maio 2011.

- LAGE-YUSTY, M.-A. et al. Chemical composition of snow crab shells ( *Chionoecetes opilio* ) Composición química del caparazón del cangrejo de las nieves ( *Chionoecetes opilio* ). **CyTA - Journal of Food**, v. 9, n. 4, p. 265–270, dez. 2011.
- LATYSHEV, N. A. et al. Lipids and of fatty acids of edible crabs of the north-western Pacific. **Food Chemistry**, v. 116, n. 3, p. 657–661, out. 2009.
- LAU, E. V.; GAN, S.; NG, H. K. Extraction Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2010, p. 1–9, 2010.
- LEFFLER, M. Treasure from trash is there profit in crab waste? **Marines Notes**, v. March-April, 1997.
- LI, J. et al. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 568–574, nov. 2011.
- LI, Z.; PAULSON, A. T.; GILL, T. A. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 733–743, dez. 2015.
- LIANG, J. et al. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 286–292, ago. 2017.
- LIM, G.-B. et al. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, n. 2–3, p. 181–187, set. 2002.
- LIU, C. et al. Immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Strongylocentrotus nudus* eggs. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 13–14, p. 1835–1841, dez. 2008.
- LIU, X.; OSAWA, T. Astaxanthin Protects Neuronal Cells against Oxidative Damage and Is a Potent Candidate for Brain Food. In: **Food Factors for Health Promotion**. Basel: KARGER, 2009. p. 129–135.
- LÓPEZ, M. et al. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. **Talanta**, v. 64, n. 3, p. 726–731, out. 2004.
- LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. v. 18, n. April, p. 160–167, 2000.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent.

**The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUANGTANA-ANAN, M. et al. Effect of Chitosan Salts and Molecular Weight on a Nanoparticulate Carrier for Therapeutic Protein. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 10, n. 2, p. 189–196, 7 jan. 2005.

MA, Y.-Q. et al. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Extracts from Ultrasonic Treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) Peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5682–5690, jul. 2008.

MACEDO, R. C. et al. Astaxanthin addition improves human neutrophils function: in vitro study. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 8, p. 447–457, 2 dez. 2010.

MACH, D. T. N.; NGUYEN, M. D.; NORTVEDT, R. Effects on digestibility and growth of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) fed fish or crab silage protein. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 3, p. 305–312, 15 jun. 2009.

MACHMUDAH, S.; WAHYUDIONO; GOTO, M. Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids. In: FORNARI, T.; STATEVA, R. P. (Eds.). . **High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015. p. 397–426.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. et al. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948–952, 15 jan. 2009.

MANO, J. F.; KONIAROVA, D.; REIS, R. L. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 2, p. 127–135, 2003.

MANTELATTO, F. L. M.; CHRISTOFOLETTI, R. A. Natural feeding activity of the crab *Callinectes ornatus* (Portunidae) in Ubatuba Bay (São Paulo, Brazil): Influence of season, sex, size and the molt stage. **Marine Biology**, v. 138, p. 585–594, 2001.

MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 3, p. 487–496, jan. 2007.

MARRONE, C. et al. Almond oil extraction by supercritical CO<sub>2</sub>: experiments and modelling. **Chemical Engineering Science**, v. 53, n. 21, p. 3711–3718, nov. 1998.

- MASOUDI, A. et al. Neuroprotective effects of astaxanthin in a rat model of spinal cord injury. **Behavioural Brain Research**, abr. 2017.
- MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444–3452, 2002.
- MAZZUTTI, S. et al. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 48–56, out. 2012.
- MAZZUTTI, S. **Extração de Compostos com Importância Biológica Provenientes de Plantago Major e Plantago Lanceolata Através de Técnicas Ambientalmente Seguras**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.
- MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 25 mar. 2011.
- MELO, G. A. S. **Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro**. São Paulo: Plêiade, 1996.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research : PTR**, v. 15, n. 2, p. 127–30, mar. 2001.
- MEOR MOHD AFFANDI, M. M. R.; JULIANTO, T.; MAJEED, A. B. A. Development and stability evaluation of Astaxanthin nanoemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. SUPPL.1, n. 4, p. 143–148, 2011.
- MERZENDORFER, H. Chitin. In: GABIUS, H. J. (Ed.). **The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences**. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2009. p. 217–229.
- MEZZOMO, N. et al. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5622–5632, jul. 2010.
- MEZZOMO, N. et al. S.Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, p. 1383–1391, 2011.
- MEZZOMO, N. **Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina,

2012.

MEZZOMO, N. et al. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Supercritical fluid extraction of carotenoid fraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 22–33, fev. 2013.

MEZZOMO, N. et al. Evidence of anti-obesity and mixed hypolipidemic effects of extracts from pink shrimp (*Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*) processing residue. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 96, p. 252–261, jan. 2015.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, n. 2, p. 131–138, fev. 2005.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, 1 jan. 1991.

MMA. **Fauna e Flora. Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado/fauna-e-flora>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561–573, 2006.

MOHSENIBANDPI, A. et al. Physicochemical characterization of ambient PM 2.5 in Tehran air and its potential cytotoxicity in human lung epithelial cells (A549). **Science of The Total Environment**, v. 593–594, p. 182–190, set. 2017.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, jan. 2010.

MORAES, C. M. et al. Physicochemical stability of poly(lactide-co-glycolide) nanocapsules containing the local anesthetic Bupivacaine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 995–1000, 2010.

MORGANTI, P.; MORGANTI, G.; MORGANTI, A. Transforming nanostructured chitin from crustacean waste into beneficial health products: a must for our society. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 4, p. 123, dez. 2011.

MORRIS, M. C.; SACKS, F.; ROSNER, B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. **Circulation**, v. 88, n. 2, p. 523–533, 1 ago. 1993.

MORTENSEN, A. et al. Comparative mechanisms and rates of free radical

scavenging by carotenoid antioxidants. **FEBS Letters**, v. 418, n. 1–2, p. 91–97, 24 nov. 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOURA, C.; SCHMIDT, C.; PINTO, L. QUITINA E QUITOSANA PRODUZIDAS A PARTIR DE RESÍDUOS DE CAMARÃO E SIRI: AVALIAÇÃO DO PROCESSO EM ESCALA PILOTO. v. 16, p. 37–45, 2006.

MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2010**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2012.

MU, J. J.; ZHAO, Q. C.; LI, J. W. The radical scavenging activity of protein hydrolysates prepared from *Mercenaria mercenaria* and *Ruditapes philippinarum*. **Advanced Materials Research**, p. 361–363, 748–752, 2012.

MUDHAKIR, D.; WIBISONO, C.; RACHMAWATI, H. Encapsulation of Risperidone into Chitosan-based Nanocarrier via Ionic Binding Interaction. **Procedia Chemistry**, v. 13, p. 92–100, 2014.

MUNDARGI, R. C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 193–209, fev. 2008.

MÜNZEL, K. CAROTENOIDS IN PHARMACEUTICAL AND COSMETIC PRODUCTS. In: **Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors**. [s.l.] Elsevier, 1981. p. 745–754.

MURAKAMI, H. et al. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, n. 2, p. 143–152, out. 1999.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. In: MUZZARELLI, R. A. A.; PETER, M. G. (Eds.). **Chitin handbook**. [s.l.] European Chitin Society, 1997. p. 109–119.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1150–1154, abr. 2000.

NAITO, Y. et al. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with

astaxanthin in diabetic db/db mice. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 20, n. 1, p. 49–59, 2004.

NAWANI, N. N.; PRAKASH, D.; KAPADNIS, B. P. Extraction, purification and characterization of an antioxidant from marine waste using protease and chitinase cocktail. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1509–1517, 7 ago. 2010.

NG, P.; GUINOT, D.; DAVIE, P. System Brachyurorum: Part I – an annotated checklist of the extant brachyurans crabs of the world. **The Raffles Bulletin of Zoology**, v. 17, p. 1–286, 2008.

NIELSEN, C. K. et al. Enhancing the antibacterial efficacy of isoeugenol by emulsion encapsulation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 229, p. 7–14, jul. 2016.

NISHINO, H. et al. Cancer prevention by natural carotenoids. **BioFactors**, v. 13, n. 1–4, p. 89–94, 2000.

NUNTHANID, J. et al. Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan Films. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 2, p. 143–157, 22 jan. 2001.

ONOGI, N. et al. Antiproliferative effect of carotenoids on human colon cancer cells without conversion to retinoic acid. **Nutrition and cancer**, v. 32, n. 1, p. 20–4, 1998.

ÖZÖĞÜL, Y. The Possibility of Using Crustacean Waste Products (CWP) on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Feeding. **Turkish Journal of Biology**, v. 24, n. 4, p. 845–854, 2000.

PANIS, G.; CARREON, J. R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. **Algal Research**, v. 18, p. 175–190, set. 2016.

PAPAS, A. M. **Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health**. Boca Raton: CRC Press, 1998.

PARIDA, U. K.; ROUT, N.; BINDHANI, B. K. In vitro properties of chitosan nanoparticles induce apoptosis in human lymphoma SUDHL-4 cell line. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1118–1127, 2013.

PARJIKOLAEI, B. R. et al. Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste. **Journal of Food Engineering**, v. 155, p. 22–28, jun. 2015.



- PAUL, S.; KUNDU, R. Antiproliferative activity of methanolic extracts from two green algae, *Enteromorpha intestinalis* and *Rizoclonium riparium* on HeLa cells. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 72, 2013.
- PENICHE, C. et al. Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 10, p. 511–520, out. 2003.
- PENICHE, C.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, M. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. In: BELGACEM, M.; GANDINI, A. (Eds.). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Science, 2008. p. 517–542.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 3 jun. 2010.
- PEREIRA, F. S. et al. Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, n. 1, p. 321–327, 27 out. 2013.
- PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 7, p. 641–678, 2009.
- PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45–61, maio 2002.
- PRABU, K.; NATARAJAN, E. Bioprospecting of shells of crustaceans. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, 2012.
- PRATT, S. Dietary prevention of age-related macular degeneration. **Journal of the American Optometric Association**, v. 70, n. 1, p. 39–47, 1999.
- PUVVADA, Y. S.; VANKAYALAPATI, S.; SUKHAVASI, S. Extraction of chitin from chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 9, 4 ago. 2012.
- QI, L.-F. et al. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 33, p. 5136–5141, 2005.
- QUIRÓS, A. R.-B.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and

plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 2–3, p. 97–111, mar. 2006.

RAFIQUE, A. et al. Chitosan functionalized poly(vinyl alcohol) for prospects biomedical and industrial applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 141–154, jun. 2016.

REBECA, B. D.; PEÑA-VERA, M. T.; DÍAZ-CASTAÑEDA, M. Production of Fish Protein Hydrolysates with Bacterial Proteases; Yield and Nutritional Value. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 2, p. 309–314, mar. 1991.

RESEARCH AND MARKETS. **Global Astaxanthin Market - Sources, Technologies and Application**. [s.l: s.n.].

REZAKHANI, L. et al. Antiproliferatory Effects of Crab Shell Extract on Breast Cancer Cell Line (MCF7). **Journal of Breast Cancer**, v. 17, n. 3, p. 219–225, 2014.

REZAKHANI, L. et al. Crab shell extract induces prostate cancer cell line (LNCap) apoptosis and decreases nitric oxide secretion. **Cell Journal(Yakhteh)**, v. 19, n. 2, p. 231–237, 2017.

RHAZI, M. et al. Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. **European Polymer Journal**, v. 38, n. 8, p. 1523–1530, ago. 2002.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603–632, jul. 2006.

RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. A. (Eds.). . **Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. 1. ed. London and New York: Springer Netherlands, 1989. p. 71–86.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P. LE. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, n. 5, p. 281–285, out. 1993.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L. Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. In: STODDART, M. J. (Ed.). . **Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press, 2011. p. 103–114.

RIZK, E. M.; EL-KADY, A. T.; EL-BIALY, A. R. Charactrization of

carotenoids (lyco-red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 1, p. 53–61, jun. 2014.

ROCHE. **Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation**. Eppstein: [s.n.]. Disponível em: <[https://shop.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001\\_05.08.pdf](https://shop.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05242134001_05.08.pdf)>.

S., S. Extraction, Characterization, Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Carotenoids from the Shell Waste of Arabian Red Shrimp *Aristeus alcocki*, Ramadan 1938. **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 2, n. 1, p. 95–103, 2011.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 391, p. 95–102, fev. 2013.

SACHINDRA, N. M. et al. Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1642–1646, 2007.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 221–225, maio 2005.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Management**, v. 26, n. 10, p. 1092–1098, 2006.

SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 10, p. 1195–1200, jul. 2005.

SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S. Effect of Protease Treatment on Oil Extractability of Carotenoids from Shrimp Waste. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, n. 1, p. 22–31, 2 fev. 2011.

SAGHEER, F. A. AL et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 410–419, jun. 2009.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 2, p. 164–173, mar. 2011.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P. et al. Extraction of  $\omega$ -3 fatty acids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste using supercritical CO<sub>2</sub>+ethanol mixtures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 71–77, jan. 2012.

SANTOS-CARBALLAL, B. et al. Physicochemical and biological characterization of chitosan-microRNA nanocomplexes for gene delivery to MCF-7 breast cancer cells. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 13567, 1 out. 2015.

SANTOS, C. R. M. **Biogeografia, sistemática e filogenia de Portunidae Rafinesque, 1815 do Oceano Atlântico Ocidental (Crustacea, Decapoda): ênfase em Callinectes Stimpson, 1860 e Portunus Weber, 1795.** [s.l.] Fundação Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

SANTOS, S. D. et al. Shrimp Waste Extract and Astaxanthin: Rat Alveolar Macrophage, Oxidative Stress and Inflammation. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. H141–H146, jul. 2012.

SASHIWA, H. et al. Chemical modification of chitosan. 14:(1) Synthesis of water-soluble chitosan derivatives by simple acetylation. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 5, p. 1126–8, 2002.

SENPHAN, T.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H. Characteristics and antioxidative activity of carotenoprotein from shells of Pacific white shrimp extracted using hepatopancreas proteases. **Food Bioscience**, v. 5, p. 54–63, mar. 2014.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 1527–1532, 1991.

SILA, A. et al. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis. **Food chemistry**, v. 148, p. 445–52, 1 abr. 2014.

SILVA, D. C. M. N. **Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* Less).** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SIMPSON, B. . et al. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1–2, p. 131–138, jan. 1998.

SINGH, J. Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants. In: HANDA, S. S. et al.

- (Eds.). . **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste: International Centre for Science and High Technology, 2008. p. 266.
- SKULBERG, O. M. Bioactive Chemicals in Microalgae. In: RICHMOND, A. (Ed.). . **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 485–512.
- SMITH, T. A. Carotenoids and cancer: prevention and potential therapy. **British Journal of Biomedical Science**, v. 55, n. 4, p. 268–275, 1998.
- SOWASOD, N. et al. Development of encapsulation technique for curcumin loaded O/W emulsion using chitosan based cryotropic gelation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 4, p. 790–798, maio 2012.
- SPINELLI, J.; LEHMAN, L.; WIEG, D. Composition, Processing, and Utilization of Red Crab ( *Pleuroncodes planipes* ) as an Aquacultural Feed Ingredient. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 31, n. 6, p. 1025–1029, jun. 1974.
- STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 101–107, maio 2005.
- STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. In: DEUTSCHER, M. P. (Ed.). . **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press Inc., 1990. p. 50–68.
- SVIRSHCHEVSKAYA, E. V et al. Antitumor Activity of Furanoalcolcolchicinoid-Chitosan Conjugate. **Medicinal chemistry**, v. 6, n. 9, 2016.
- TOLASA, S.; CAKLI, S.; OSTERMEYER, U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 6, p. 787–791, 11 nov. 2005.
- TOMINAGA, K. et al. Protective effects of astaxanthin against singlet oxygen induced damage in human dermal fibroblasts in vitro. **Carotenoid Science**, v. 15, p. 44–6, 2010.
- TOMINAGA, K. et al. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 1, p. 43–47, 2012.
- TRABELSI, I. et al. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 36–42, out. 2013.

UMESH HEBBAR, H.; SUMANA, B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Use of reverse micellar systems for the extraction and purification of bromelain from pineapple wastes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4896–4902, jul. 2008.

UZUN, I.; ÇELİK, Ö. Physicochemical Characterization and the Comparison of Chitin and Chitin Modified with Maleic Anhydride. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 619–627, 20 jun. 2015.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303–313, jul. 2001.

VIRGA, R. H. P. **Análise quantitativa de metais pesados (Cd, Cr, Cu, Pb e Zn) em iris-azuis dos gênero Callinectes sp (crustacea, portunidae) provenientes do Rio Cubatão, Cubatão, São Paulo, Brasil.** [s.l.] Universidade Católica de Santos, 2006.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. E. Materials for Encapsulation. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. (Eds.). **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing.** New York, NY: Springer New York, 2010.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, jun. 2006.

WANJUN, T.; CUNXIN, W.; DONGHUA, C. Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 3, p. 389–394, mar. 2005.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 578–585, jul. 2013.

WYSOKOWSKI, M. et al. Modification of Chitin with Kraft Lignin and Development of New Biosorbents for Removal of Cadmium(II) and Nickel(II) Ions. **Marine Drugs**, v. 12, n. 4, p. 2245–2268, 10 abr. 2014.

WYSOKOWSKI, M. et al. Solvothermal synthesis of hydrophobic chitin–polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 224–229, jul. 2015.

XU, Y. X. et al. Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185–192, mar. 2005.

- YAN, N.; CHEN, X. Don't waste seafood waste. **Nature**, v. 524, p. 155–157, 2015.
- YEN, M.-T.; MAU, J.-L. Physico-chemical characterization of fungal chitosan from shiitake stipes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 472–479, abr. 2007.
- YEN, M. T.; YANG, J. H.; MAU, J. L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 15–21, 2009.
- YOKSAN, R.; JIRAWUTTHIWONGCHAI, J.; ARPO, K. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 292–297, mar. 2010.
- YOUNES, I. et al. Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 489–498, ago. 2014.
- ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394–400, abr. 2010.
- ZENG, M.; LU, L.; XU, Q. Morphological and Thermal Investigations of Chitin-Based Nanocomposites 83. In: DUFRESNE, A.; THOMAS, S.; POTHAN, L. A. (Eds.). . **Biopolymer Nanocomposites: Processing, Properties, and Applications**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2013. p. 696.
- ZETZEL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. **Standardized low-cost batch SFE units for University Education and Comparative Research**. Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids. **Anais...Versailles**: 2003
- ZHANG, N.; YAMASHITA, Y.; NOZAKI, Y. Effect of protein hydrolysate from Antarctic krill meat on the state of water and denaturation by dehydration of lizard fish myofibrils. **Fisheries Science**, v. 68, n. 3, p. 672–679, jun. 2002.
- ZHANG, Q. et al. Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1607–1613, 2012.
- ZHAO, X. et al. Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 197–203, jul. 2016.

ZHAO, Y. et al. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioidea* hydrolysate. **Peptides**, v. 30, n. 6, p. 1028–1033, jun. 2009.

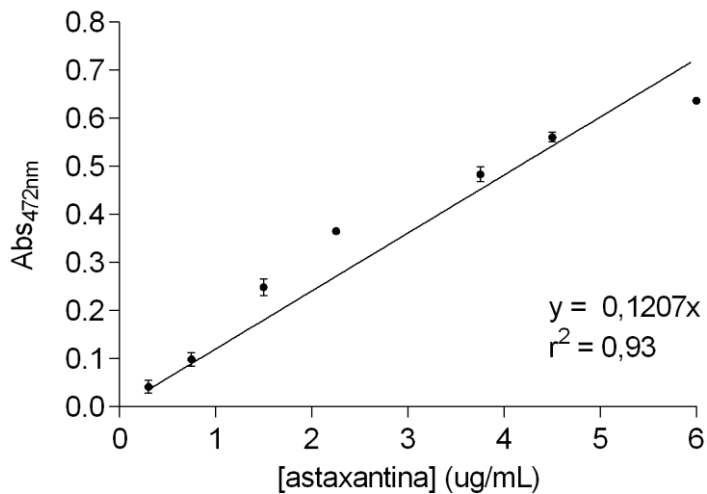
ZHAVEH, S. et al. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 251–256, jul. 2015.



## APÊNDICE

## APÊNDICE I

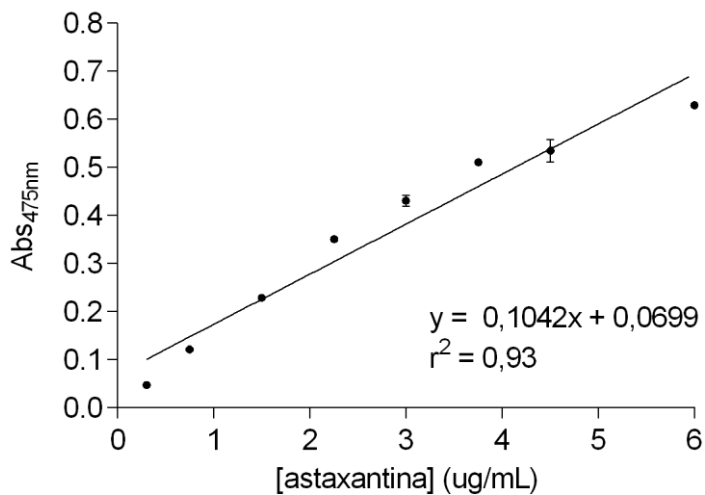
Figura A.I - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em *n*-hexano, com absorvância no comprimento de onda de 472 nm, para o cálculo de quantidade de astaxantina nos extratos de resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*).





**APÊNDICE II**

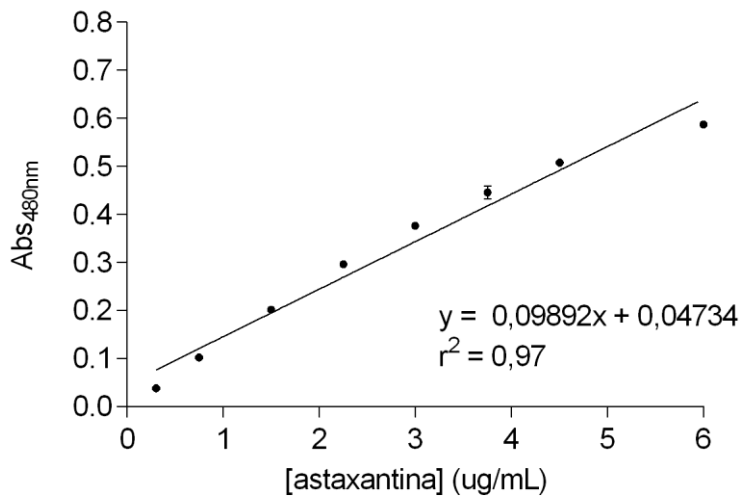
Figura A.II - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em acetona, com absorvância no comprimento de onda de 475 nm, para o cálculo de quantidade de astaxantina nos extratos de resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*).





**APÊNDICE III**

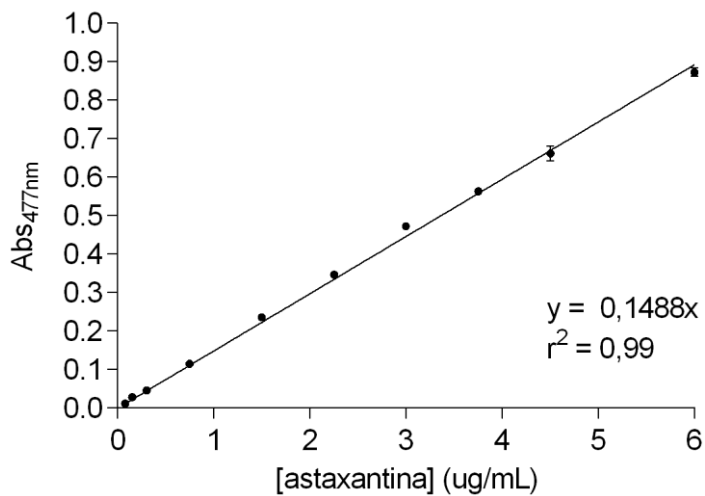
Figura A.III - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em etanol, com absorbância no comprimento de onda de 480 nm, para o cálculo de quantidade de astaxantina nos extratos de resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*).





**APÊNDICE IV**

Figura A.IV - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em Acetona:Etanol (50:50, v/v), com absorvância no comprimento de onda de 477 nm, realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia e Biotecnologia de Plantas da Universidade de Münster (Alemanha), para o cálculo de quantidade de astaxantina no extrato de resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*).







**APÊNDICE V**

Figura A.V - Curva analítica de astaxantina padrão dissolvida em *n*-hexano, com absorvância no comprimento de onda de 472 nm, realizada no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia e Biotecnologia de Plantas da Universidade de Münster (Alemanha), para o cálculo de eficiência de encapsulamento do extrato de resíduo de siri-azul (*Callinectes sapidus*).

