



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO



CLEIDIJANE ANTERO DOS SANTOS

**ESTRATÉGIAS PARA A EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA FARINHA DO
RESÍDUO DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

NATAL/RN

2020

CLEIDIJANE ANTERO DOS SANTOS

ESTRATÉGIAS PARA A EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA FARINHA DO
RESÍDUO DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a defesa da dissertação.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cristiane Fernandes de Assis

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha

NATAL/RN

2020

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Santos, Cleidijane Antero dos.

Estratégia para a extração de astaxantina da farinha do resíduo de camarão (*Litopenaeus vannamei*) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana / Cleidijane Antero dos Santos. - 2020.

65f.: il.

Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Natal, RN, 2020.

Orientadora: Cristiane Fernandes de Assis.

Coorientador: Carlos Eduardo de Araújo Padilha.

1. Cromatografia líquida - Dissertação. 2. Astaxantina-
Dissertação. 3. Antimicrobiano - Dissertação. 4. Antioxidante -
Dissertação. 5. Carotenoides - Dissertação. I. Assis, Cristiane
Fernandes de. II. Padilha, Carlos Eduardo de Araújo. III. Título.

CLEIDIJANE ANTERO DOS SANTOS

ESTRATÉGIAS PARA A EXTRAÇÃO DE ASTAXANTINA DA FARINHA DO
RESÍDUO DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em ____ de _____ de _____.

Prof^a. Dr^a. Karine Cavalcanti Maurício de Sena Evangelista

Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Nutrição
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristiane Fernandes de Assis

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Orientadora

Dr. Carlos Eduardo Padilha

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Co- Orientador

Prof^a. Dr^a. Natália Kelly de Araújo

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte – IFRN
Membro Externo

Prof^a. Dr^a. Juliana Kelly da Silva Maia

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Membro Interno

*A minha família, meu esposo, e meu filho
Gustavo. Essa vitória é nossa!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado toda a força, saúde e sabedoria necessários para seguir nessa jornada, por ter sido meu guia e iluminado os meus passos. Ele que sabe o momento certo de cada coisa, e que a cada dia me mostra que os planos d'Ele são maiores que os meus.

Aos meus pais Jacinto e Odilene, que dedicaram as suas vidas em função de mim e dos meus irmãos, e nunca mediram esforços para que nós pudéssemos ter acesso à educação. Muito obrigada por toda dedicação, amor e carinho, por terem acreditado em mim, e me incentivado a não desistir.

Aos meus irmãos, Jaciane, Joicy e Jackson, por todo apoio e incentivo. A Jaciane e meu cunhado Idarlan que me acolheram em sua casa por todo esse tempo, pela compreensão e toda ajuda. Meu muito obrigada!

Ao meu esposo e companheiro, que durante todo esse tempo me ajudou a acreditar que eu iria conseguir. Foi ele que me apoiou, me deu forças, e entendeu todos os momentos que eu estive ausente.

Ao meu filho Gustavo que carrego em meu ventre, chegou no momento certo, me deu mais força nessa reta final, e me fez companhia durante esses últimos dias de trabalho no laboratório.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Cristiane Fernandes de Assis, que me acolheu de uma forma inexplicável, me acalmou nos momentos de angústia, me ensinou o “caminho das pedras” e foi fundamental para a realização deste trabalho. És uma profissional incrível, com inúmeras qualidades que nem consigo descrever... você foi capaz de tornar tudo mais leve. Muito obrigada por tudo!

Ao meu coorientador Dr. Carlos Eduardo de Araújo Padilha, por toda calma e paciência, que esteve comigo desde o começo, me ajudou, me compreendeu e contribuiu de forma maravilhosa com essa intensa jornada. Não tenho como agradecer-lo em poucas linhas... Minha eterna gratidão!

As professoras colaboradoras Prof^{as}. Dra. Thais Souza Passos e Dra. Karla Suzzane por suas contribuições neste trabalho. Vocês são inspirações de pessoas e profissionais.

Aos queridos colegas de mestrado (a turma do “Vai dar certo!”), nós sabemos o quanto o apoio mútuo foi imprescindível para que conseguíssemos concluir esse mestrado. Aos momentos de comensalidade e diversão que tivemos.

Aos colegas Anderson, Neyna e Pedro, que me ajudaram tanto com as idas e vindas nos laboratórios. Obrigada pela competência e dedicação. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do PPGNUT e laboratórios pelos ensinamentos, vocês que deram suporte e contribuíram de forma grandiosa para a obtenção deste título.

A minha eterna gratidão a todos que me deram força e contribuíram direta ou indiretamente para a construção desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*O navio está seguro quando está no porto, mas
não é para isso que se fazem navios.*

Autor desconhecido.

RESUMO

A astaxantina é o principal pigmento carotenoide encontrado nos resíduos do camarão, e apresenta inúmeras propriedades benéficas para a saúde humana. A extração da astaxantina pode ser feita utilizando diferentes solventes orgânicos, porém o uso desses está sendo substituído por opções mais sustentáveis como os “*Deep Eutectic Solvents*” (DES), por serem considerados uma alternativa eficiente na extração de compostos polares e apolares. O objetivo desse trabalho foi propor uma estratégia de aumento do rendimento da extração de astaxantina, a partir de farinha de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, usando etanol como fase extratante e DES (glicerol-cloreto de colina) e cloreto de colina como adjuvantes com e sem o uso do ultrassom. A quantificação da astaxantina foi feita por espectrofotometro e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a análise dos ácidos graxos por Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-MS). As propriedades bioativas dos extratos foram avaliadas através da atividade antioxidante (por 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico – ABTS, e sequestro do radical 1,1-diphenil-2-picrilhidrazil - DPPH) e antimicrobiana por modulação. Os resultados mostram que o ultrassom, o tempo de exposição e o uso do DES são os fatores que mais interferem na extração da astaxantina. Sob condições assistidas por ultrassom, a adição de 5% (m/v) de menores tempos de incubação quando comparados com extrações envolvendo apenas etanol (concentração máxima de 30,99 µg/g de farinha após 30 min). A análise do perfil de ácidos graxos mostrou uma maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados (35,23% e 33,79%, respectivamente). O Valor de IC 50 para o ABTS foi 1,18 mM e a inibição do radical DPPH foi 22,65%. A atividade antibacteriana mostrou efeito inibitório significativo na concentração mínima de 1024µg/mL, cujos valores foram estatisticamente semelhantes àqueles obtidos da astaxantina sintética. O processo de extração da astaxantina utilizando etanol com adição de 5% (m/v) de DES aliado ao ultrassom foi eficiente. Esses resultados agregam valor ao produto por ser extraído de um resíduo que possibilita a diminuição de impacto ambiental além da utilização de solventes verdes.

Palavras-chave: cromatografia líquida de alta eficiência, ultrassom, antimicrobiano, antioxidante, carotenoides.

ABSTRACT

Astaxanthin is the main carotenoid pigment found in shrimp residues, and has numerous beneficial properties for human health. The extraction of astaxanthin can be done using different organic solvents, however the use of these is being replaced by more sustainable options such as “Deep Eutectic Solvents” (DES), as they are considered an efficient alternative in the extraction of polar and nonpolar compounds. The objective of this work was to propose a strategy to increase the yield of the extraction of astaxanthin, from shrimp flour of the species *Litopenaeus vannamei*, using ethanol as extracting phase and DES (glycerol-choline chloride) and choline chloride as adjuvants with and without the use of ultrasound. The quantification of astaxanthin was done by spectrophotometer and high performance liquid chromatography (HPLC), the analysis of fatty acids by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometer (CG-MS) and the bioactive properties of the extracts were evaluated through antioxidant activity (by 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid - ABTS, and sequestration of the radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil - DPPH) and antimicrobial by modulation. The results show the ultrasound, the exposure time, as well as the use of DES are the factors that most interfere in the extraction of astaxanthin. Under conditions assisted by ultrasound, the addition of 5% (m / m) of shorter incubation times when compared to extractions involving only ethanol (maximum concentration of 30.99 µg / g of flour after 30 min). The analysis of the fatty acid profile showed a greater amount of polyunsaturated fatty acids. It was possible to obtain a value of 1.18 M inhibition of the ABTS radical, and 22.65% of the DPPH radical. The antibacterial activity showed a significant inhibitory effect at the minimum concentration of 1024µg / mL, whose values were statistically similar to those obtained from synthetic astaxanthin. The extraction process of astaxanthin using ethanol with the addition of 5% (m / m) of DES combined with ultrasound was efficient. These results add value to the product as it is extracted from a residue that allows the reduction of environmental impact in addition to the use of green solvents.

Keywords: high performance liquid chromatography, ultrasound, antimicrobial, antioxidant, carotenoids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Molécula de astaxantina alinhada na bicamada lipídica. Fonte: Saini et al. (2018)

Figura 2 – Estrutura química da astaxantina.

Figura 3 – Rendimento da extração de carotenoides totais (mg/g) da farinha do resíduo de camarão no banho-maria (barras brancas) e no banho ultrassônico (barras pretas) a 60°C. (A) 10 minutos. (B) 30 minutos. (C) 50 minutos. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste de Análise de Variância-ANOVA seguido de pós teste de Tukey. Resultados com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas 95% de confiança ($p > 0,05$).

Figura 4 – Perfis cromatográficos do HPLC. A – astaxantina sintética, B – extrato rico em astaxantina.

Figura 5 - Resultado do FTIR. EA – extrato rico em astaxantina, DES – solvente eutético profundo, AST – astaxantina sintética.

Figura 6 – Resultado da atividade microbiana. A = Resultado do teste realizado com a astaxantina padrão Sigma®, B = Resultado do teste realizado com o extrato rico em astaxantina. ****Valor estatisticamente significativo ($p < 0,0001$)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das condições de tempo, temperatura e concentração de agente extratante para a obtenção da astaxantina.

Tabela 2 - Valores de equivalentes de astaxantina (mg/g) encontrados nas extrações. Valores expressos por média (desvio padrão). A = sem ultrassom, B = com ultrassom.

Tabela 3 - Comparação do resultado da quantidade de astaxantina extraída da farinha do resíduo de camarão, sob as diferentes condições testadas. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Resultados com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas 95% de confiança ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Resultado da quantidade de astaxantina extraída da farinha do resíduo de camarão de acordo com a análise de CLAE. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Resultados com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas 95% de confiança ($p > 0,05$).

Tabela 5 - Resultado da esterificação dos ácidos graxos.

Tabela 6 - Resultado da atividade antioxidante por eliminação do radical DPPH. Os valores são comparados entre si por meio de análise de variância com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC	Associação Brasileira dos Criadores de Camarão
ABTS	2,2'-AZINO-BIS(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-ÁCIDO SULFÔNICO)
ANOVA	Análise de Variância
BHI	Caldo Cérebro Coração
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DES	<i>Deep eutectic solvents</i>
DHA	Ácido docosaexanoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 1,1-diphenil-2-picrilhydrazil - DPPH
EPA	Ácido eicosapentanoico
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPA	Álcool isopropílico
KOH	Hidróxido de potássio
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 PRODUÇÃO DE CAMARÃO E APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA CARCINICULTURA.....	20
3.2 CAROTENOIDES.....	20
3.2.1 Astaxantina	21
3.2.1.1 Fontes de astaxantina	21
3.2.1.2 Estrutura e funções da astaxantina	21
3.3 FORMAS DE EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA.....	24
3.4. SOLVENTES VERDES	25
3.5 LÍQUIDOS IONICOS	26
3.6 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS - DES	27
3.7 ÉTICA E IMPORTANCIA SOCIAL	28
4. METODOLOGIA	30
4.1 MATÉRIA-PRIMA.....	30
4.2 SÍNTESE DE DES E EXPERIMENTOS DE EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA....	30
4.3 REMOÇÃO DE CONTAMINANTES.....	31
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	32
4.4.1 Quantificação da astaxantina	32

4.4.1.1 Determinação de carotenoides totais	32
4.4.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	32
4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA AMOSTRA	33
4.6. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR	33
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
4.7.1 Atividade antioxidante por [2,2'-AZINO-BIS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] - ABTS	34
4.7.2 Atividade antioxidante por sequestro do radical 1,1-diphenil-2- picrilhydrazil - DPPH	34
4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS POR EXTRAÇÃO DE FARINHA DO RESÍDUO DE CAMARÃO	37
5.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS	39
5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE	42
5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR	45
5.5 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS	46
5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ASTAXANTINA RECUPERADA	48
5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	49
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a produção brasileira de camarão vem aumentando significativamente, e a região Nordeste é a maior produtora, sendo responsável por 98% da produção nacional da espécie *Litopenaeus vannamei*.¹ A produção de camarão gera uma alta quantidade de resíduos, uma vez que a maior parte destinada para fins alimentícios é comercializada como filé congelado.^{2,3} Os resíduos gerados a partir do beneficiamento do camarão são formados basicamente pela casca e cefalotórax, e podem corresponder de 50-60% do peso do crustáceo.³⁻⁵ Esses resíduos, geralmente são jogados clandestinamente em mares e rios, ou enterrados causando problemas ambientais, principalmente em locais onde não há fiscalização ambiental rigorosa.⁶ A eliminação dos resíduos gera despesas para as empresas beneficiadoras, ocasionando redução nos lucros, e o desperdício de compostos que podem ser aproveitados pela indústria. Os descartes do processamento de camarão são fontes de proteínas, quitina e pigmentos carotenoides, entre eles, a astaxantina.^{2,4,7}

Atualmente, o interesse em compostos bioativos derivados de recursos naturais está em crescente desenvolvimento, pois tem forte influência sobre a saúde, especificamente aqueles que atuam em alvos envolvidos com diversas doenças, como por exemplo, as doenças crônicas não transmissíveis (diabetes, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, entre outras).⁸

A astaxantina é um pigmento naturalmente presente em alimentos, e apresenta uma série de propriedades benéficas, tais como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, anticâncer, antidiabetes, previne doenças cardiovasculares e atua também na prevenção de catarata^{9,10}. Alguns estudos apontam que a atividade antioxidante da astaxantina é superior à de outros carotenoides, sendo 10 vezes maior que a β -caroteno, cantaxantina, luteína e zeaxantina.¹¹ Diante dessas vantagens, a recuperação de astaxantina a partir de resíduos de camarão garante um aproveitamento integral, uma vez que agrega valor ao produto que possui alto valor biotecnológico e financeiro, além de diminuir o impacto ambiental.¹²

A estrutura peculiar da astaxantina confere uma resistência à entrada de espécies reativas de oxigênio em membranas celulares, seja pela porção hidrofóbica,

seja pela porção hidrofílica devido ao alinhamento com a camada fosfolipídica,^{13,14,15} conforme mostrado na Figura 1.

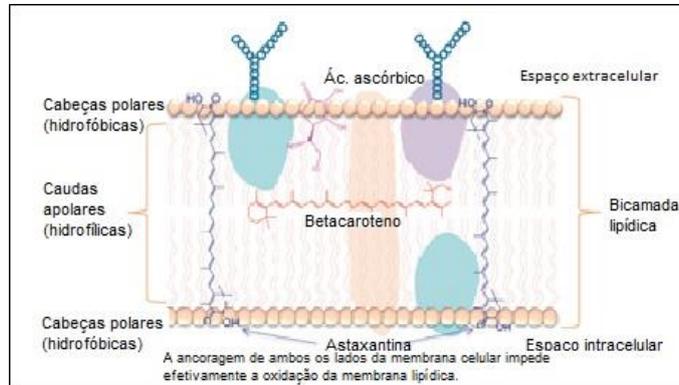


Figura 1. Molécula de astaxantina alinhada na bicamada lipídica. Fonte: Saini et al. (2018).¹⁶

No sentido de recuperar a astaxantina da matriz sólida, diferentes técnicas de extração podem ser aplicadas, tais como extração com óleo vegetal, ultrassom, micro-ondas, fluido supercrítico, entre outros.¹⁷ Solventes eutéticos profundos (DES) possibilitam o ajuste de polaridade em extrações e são considerados solventes “verdes”, o que é interessante para a recuperação de compostos bioativos a partir de fontes naturais, uma vez que facilita o contato do solvente com a amostra.^{18,19,20,21}

As indústrias buscam cada vez mais inovar os seus produtos para uma maior abrangência e crescimento no mercado, visando atender melhor os consumidores.²² Apesar do conhecimento de suas propriedades bioativas, a incorporação da astaxantina obtida de resíduos da carcinicultura em matrizes alimentares tem sido pouco relatada na literatura.²³ Nesse sentido, a melhor compreensão dos métodos de extração e conservação dos carotenoides possibilita reaproveitar resíduos e potencializar o uso como corante natural na indústria de alimentos à base de gorduras, tais como, laticínios, sorvetes e produtos de confeitaria.^{4,24,25}

Assim, o presente estudo tem por objetivo o aproveitamento do resíduo do camarão para a extração da astaxantina através de uma metodologia utilizando solventes verdes. Os DES são considerados uma alternativa ambientalmente sustentável, visto o menor impacto ambiental que é causado pelo uso dessas

substâncias, além de serem capazes de acelerar os processos de extração, otimizando o tempo e economizando recursos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair astaxantina do resíduo de camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* utilizando DES como adjuvante e avaliar as propriedades antioxidantes e antimicrobiana do extrato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair a astaxantina da farinha do resíduo de camarão utilizando solventes eutéticos profundos e ultrassom;
- Definir a melhor condição de extração da astaxantina;
- Quantificar a astaxantina extraída por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Caracterizar a amostra de acordo com o perfil de ácidos graxos e a FTIR (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)
- Avaliar as propriedades antioxidantes da astaxantina após a extração com solventes eutéticos profundos;
- Verificar a atividade antimicrobiana através de análises de inibição *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO DE CAMARÃO E APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DA CARCINICULTURA

A carcinicultura no Brasil teve aumento significativo desde 1984, ano que foi criada a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), quando foi introduzida a espécie *Litopenaeus vannamei* com boa adaptabilidade para esta atividade, que apresenta coloração típica, carne de boa qualidade, e é bem aceita pelo mercado internacional.^{26,27} Em geral, os consumidores apreciam apenas o filé de camarão, há, dessa forma, produção de grande quantidade de resíduos. Os resíduos dessa produção incluem a casca e o cefalotórax, que são responsáveis por 50% a 60% do peso da espécie.^{3,7} O principal impacto causado por essa atividade inclui o aumento do volume de aterros e, quando descartados em corpos hídricos, podem provocar a contaminação bem como eutrofização.²⁸

Esses resíduos são fontes de compostos que podem ser aproveitados na indústria,^{2,4} são eles quitina, lipídeos e pigmentos carotenoides, principalmente astaxantina que tem múltiplas aplicações tecnológicas.^{3,5,29} A astaxantina é o principal pigmento carotenoide encontrado no camarão, em sua maior parte nos resíduos, de forma conjugada com proteínas (carotenoproteínas). A dieta dos animais é o fator que mais contribui para a absorção desses carotenoides e influencia diretamente na pigmentação do crustáceo.²⁴

A cor dos alimentos é um dos principais atrativos para o consumidor, e a aplicação desses resíduos de camarão em produtos alimentícios pode maximizar o valor nutricional, além de contribuir para uma melhor avaliação sensorial desses alimentos.^{4,30} De acordo com Fernandes (2009)³¹ os resíduos de camarão podem ser aproveitados como matéria-prima na elaboração de produtos alimentícios, uma vez que são de baixo custo, e com esse aproveitamento, reduzirá a poluição ambiental. Uma alternativa que agrega valor comercial para os resíduos do beneficiamento de camarão é o seu uso para extração dos compostos existentes, pois existe demanda na indústria alimentícia, farmacêutica e na fabricação de ração animal.³²

3.2 CAROTENOIDES

Carotenoides são os compostos bioativos dos alimentos mais estudados no âmbito alimentar devido as suas inúmeras características, desde as propriedades físico-químicas até as suas implicações na saúde humana.³³ Os carotenoides presentes nos alimentos são em sua grande parte tetraterpenoides (C40), compostos por oito unidades isoprenóides (C5). Por ter um sistema de dupla ligação conjugada, este serve como cromóforo e absorve luz, o que é responsável pela cor vermelha, laranja ou amarela dos alimentos. Na natureza os carotenoides podem ser encontrados em duas formas, tanto na sua forma *trans*, que é mais estável, mais comum, e confere coloração mais escura, porém também existem na forma *cis* que gradualmente perde a cor.³³

Carotenos são chamados os carotenoides que apresentam em sua estrutura apenas carbono e hidrogênio e são altamente apolares, com variados graus de insaturação, entre eles estão o α -caroteno, β -caroteno e o licopeno. Essa mesma estrutura, quando apresenta uma molécula de oxigênio é denominado xantofila, que tem característica mais polar, e entre elas podemos citar luteína, zeaxantina e astaxantina.^{33,34}

3.2.1 Astaxantina

3.2.1.1 Fontes de astaxantina

A astaxantina pode ser encontrada em uma grande variedade de organismos, como por exemplo em bactérias, algas, leveduras, plantas, crustáceos e peixes.^{8,10} No ambiente marinho, a biossíntese da astaxantina acontece por microalgas, que são ingeridas pelos insetos, crustáceos e peixes, que acumulam o carotenoide.³⁵

3.2.1.2 Estrutura e funções da astaxantina

A astaxantina é um carotenoide xantofila, cuja molécula possui em sua estrutura 40 átomos de carbono, apresenta em cada extremidade um anel ionona com uma cadeia de ligações duplas conjugadas (Figura 2).

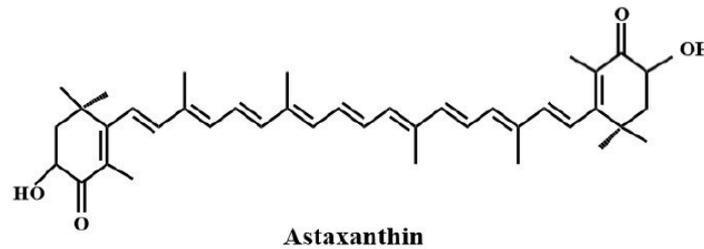


Figura 2. Estrutura química da astaxantina. Fonte: Delgado et al.³⁶

Essa molécula apresenta atividade antioxidante semelhante à dos outros carotenoides, porém com algumas propriedades diferenciadas devido a sua estrutura.^{37,38} A hidroxila e carbonila apresentada em cada anel, é responsável por determinadas propriedades da astaxantina, incluindo, o alto poder antioxidante.³⁹

Ao comparar a atividade antioxidante de diversos carotenoides como licopeno, α -caroteno, β -caroteno, e luteína, a astaxantina foi quem apresentou o maior poder antioxidante.⁴⁰ Em um estudo realizado por Miki (1991),⁴¹ o poder antioxidante da astaxantina foi 10 vezes maior que a luteína, cataxantina, zeaxantina e β -caroteno, e 100 vezes maior que o α -tocoferol.

Esse carotenoide protege o organismo dos danos oxidativos por vários mecanismos, entre eles: eliminação de radicais livres, inibição da peroxidação lipídica, aumento da função imune e regulação da expressão gênica.⁸ A astaxantina também age contra a inflamação, uma vez que é um antioxidante potente para terminar com a indução da inflamação nos sistemas biológicos.⁸

Park et al. (2010)⁴² observaram que a astaxantina foi capaz de diminuir a inflamação do biomarcador de dano oxidativo do DNA, aumentando a resposta imunológicas em mulheres adultas saudáveis. Bennedsen et al. (1999)⁴³ constataram que a astaxantina foi capaz de reduzir a inflamação gástrica e a carga bacteriana de camundongos infectados por *Helicobacter pylori*. A capacidade antioxidante, imunomoduladora e anti-inflamatória da astaxantina provavelmente pode exercer influência sobre a etiologia do câncer e de doenças inflamatórias.⁴²

A suplementação da astaxantina em ratos diabéticos foi capaz de diminuir os níveis de glicose de jejum, e melhorar a tolerância à glicose.⁴⁴ Alguns estudos mostraram que a astaxantina é capaz de inibir a carcinogênese em modelos animais, a administração desse carotenoide foi capaz de melhorar a potência antineoplásica quando comparados com animais não tratados.⁴⁵ A função imunomoduladora da

astaxantina está ligada a capacidade desse carotenoide em aumentar a produção de IgA, IgM e IgG, e induzir a atividade de citocinas.²⁴ A astaxantina inibe a oxidação do colesterol LDL prevenindo a formação de placas nas paredes dos vasos sanguíneos, e conseqüentemente, prevenindo a aterosclerose. Além disso, mostrou-se capaz de diminuir a pressão sanguínea de ratos hipertensos.^{24,46}

Devido a essa propriedade antioxidante e do papel como corante, a astaxantina sintética é amplamente utilizada na indústria alimentícia.⁴⁷ O uso industrial de aditivos alimentares na maior parte dos países é regado. No geral, as legislações pertinentes de cada país especificam quais os corantes podem ser utilizados, a fonte, a pureza, e em qual o tipo de alimento pode ser utilizado.²³ Dessa forma, a extração de astaxantina oriunda de fontes naturais é uma das atividades mais bem-sucedidas da biotecnologia, uma vez que pode ser utilizada em diversas aplicações alimentícias e farmacêuticas, inclusive como nutracêuticos.⁸

Os carotenoides extraídos de produtos naturais são de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica, uma vez que são úteis na prevenção da deterioração que ocorre durante o processamento e armazenamento dos produtos, podendo ser usado em substituição dos antioxidantes sintéticos.⁴⁸

A astaxantina em sua forma conjugada com proteínas apresenta a cor azulada ou esverdeada,⁴⁹ em sua forma livre, a sua cor característica é laranja-avermelhada devido às ligações duplas conjugadas no centro da molécula. Para a extração de astaxantina esse complexo é desfeito e ocorre a liberação da cor característica da molécula.⁸

Na membrana celular, a astaxantina se liga de dentro para fora devido a sua estrutura molecular distinta é capaz de se ligar a bicamada lipídica, conseguindo localizar-se tanto na parte externa (parte polar) quando interna da membrana (parte apolar), dessa forma, é capaz de proporcionar melhor proteção quando comparada ao β -caroteno e a vitamina C, que se posicionam apenas na parte interna da bicamada lipídica.⁸

A astaxantina encontrada em sua forma natural é mais estável, pois encontra-se associada com outros compostos.¹¹ Porém, para torná-la mais disponível para a aplicação é necessário isolar a molécula. Quando extraído, o pigmento se torna instável o que o torna mais susceptível à degradação quando exposto a inúmeras condições, inclusive, as industriais, as quais podemos citar a exposição ao oxigênio, pH, temperatura e luz.^{50,10}

Há um crescente interesse em alimentos saudáveis e nutritivos, que apresentem em sua composição compostos bioativos, tais como carotenoides e vitaminas antioxidantes.⁵¹ Sabendo disso, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que venham definir melhores condições de extração, purificação e uso desses pigmentos, para posterior aplicação em matrizes alimentares.

3.3 FORMAS DE EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA

A astaxantina, por ser um composto lipofílico, pode ser dissolvida em solventes apolares e óleos.⁸ Para que ocorra a liberação da astaxantina, é necessário que ocorra a remoção das proteínas que estão formando o complexo carotenoproteína, libertando assim a cor laranja-avermelhada característica desse pigmento.^{24,52}

A técnica de extração com solvente é aplicada em diversas matrizes, com o objetivo de facilitar a transferência de massa, o rendimento da extração é influenciado por diversos fatores, entre eles o tipo do solvente, tempo e temperatura de extração.⁵³

Os solventes orgânicos mais utilizados para a extração da astaxantina são metanol, éter de petróleo, acetona, hexano, álcool isopropílico (IPA), etilmetilcetona e acetato de etila.²⁴ O uso de determinados tipos de solventes convencionais para aplicação na indústria alimentícia não é permitido, pois apesar da eficiência no processo de extração, alguns tem poder carcinogênico, e por isso, são impróprios para aplicação em alimentos.⁵⁴

Zhang et al. (2014)⁵⁵ realizaram a extração de astaxantina dos resíduos de camarão utilizando diferentes parâmetros, e concentrações de solventes. Nesse estudo, os autores verificaram que os solventes metanol, acetona e hexano permitiram elevados rendimentos de extração.

O etanol e acetona são os solventes mais comumente utilizados para a extração de carotenoides quando comparados com outros solventes.⁵⁶ A utilização de adjuvantes no processo de extração de compostos bioativos é capaz de diminuir o uso dos solventes, o tempo de extração e aumentar o rendimento, o que é de interesse para a extração desses compostos.⁵⁷ A extração da astaxantina pelo método de ultrassom é uma tecnologia considerada segura e ecológica, que foi desenvolvida com base na extração tradicional.^{10,58} É considerado um método eficaz, sendo realizado

em conjunto com os solventes eutéticos,²⁴ e é capaz de aumentar o contato do solvente com a amostra, devido a capacidade de cavitação.⁵⁹

Vários sistemas para a extração da astaxantina têm sido relatados na literatura, como: extração com óleo, extração com solvente, extração por fluido supercrítico, extração assistida por ultrassom, entretanto em alguns desses, a quantidade extraída é baixa.¹⁹ O desenvolvimento de novos métodos de extração surgiu devido aos problemas ocasionados pelos métodos convencionais.²⁴ Zhang, Tang e Row (2014),⁵⁵ realizaram a extração de astaxantina de resíduos de camarão utilizando a combinação de solventes convencionais com o ultrassom. E de acordo com os autores, é de extrema importância total controle das variáveis, que incluem, o solvente, a potência do ultrassom e o tempo empregado em todas as etapas do processo.²⁴

Existe a preocupação dos pesquisadores com relação à redução dos resíduos gerados, a utilização de solventes e reagentes mais seguros, de preferência por agentes obtidos de fontes renováveis, o uso eficiente de energia e minimização do risco de acidentes, sendo esses os objetivos almejados pela química verde.²¹

3.4. SOLVENTES VERDES

A química verde, em resumo, é definida como a criação, projeção e aplicação de produtos e processos químicos visando a redução e/ou eliminação do uso e a origem de substâncias perigosas.²⁵ A extração verde e tecnologia verde tanto em escala laboratorial, quanto industrial, é baseada na descoberta de processos que devem reduzir o consumo de energia, permitindo o uso de solventes alternativos e produtos naturais oriundos de fontes renováveis,²⁵ visando a proteção do meio ambiente e dos consumidores.^{21,61}

Para que um solvente seja considerado verde, ele deverá apresentar as seguintes características: disponibilidade, baixo preço, reciclabilidade, baixa toxicidade, bom desempenho (em comparação com outros solventes), ser de fácil síntese, de fácil armazenamento, renovável, não ser inflamável, ser estável, biodegradável e elevado grau de pureza.⁶² Porém, não existe nenhum solvente que atenda a essas doze características citadas.⁶² Só existe apenas um solvente considerado legitimamente verde, que é a água, pois é a única que se encaixa em todos os princípios da química verde.⁶³ Sabendo disso, um solvente é considerado

verde quando é a melhor opção a ser utilizada pensando na aplicação e finalidade específica de cada situação.⁶⁴

Os solventes convencionais estão sendo substituídos pelos solventes verdes, tendo em vista as inúmeras aplicações tanto científicas como tecnológicas que os mesmos apresentam.⁶⁵ Os solventes são utilizados para estabilizar estados de transição, melhorar o contato entre reagentes, e para isolar determinados compostos.⁶² A maior parte desses solventes é volátil e inflamável, que podem causar problemas de saúde, e ser responsáveis pela poluição ambiental e efeito estufa, por isso, o meio ambiente, a segurança e os aspectos econômicos estão contribuindo para que a indústria passe a produzir solventes considerados verdes.^{61,64,66}

O uso dos líquidos iônicos tem algumas vantagens que incluem: estabilidade térmica, não ser volátil, não ser inflamável,⁶¹ se misturar com várias substâncias e ser modificado facilmente. Além disso, é considerado um processo ambientalmente sustentável.⁶⁵ Os líquidos iônicos e os solventes eutéticos profundos são atrativos devido ao seu potencial na química verde e as propriedades físico-químicas que os mesmos apresentam, são aplicados em processos de extração para remoção de contaminantes, isolamento de compostos específicos, purificação de combustíveis, entre outros.⁶⁵

3.5 LÍQUIDOS IONICOS

Líquidos iônicos são solventes que consistem apenas em íons⁶⁷ (baseados em colina e em imidazólio, por exemplo), e são utilizados em diferentes áreas, devido a sua alta estabilidade térmica e química.^{61,68} As propriedades desses compostos incluem: baixa pressão de vapor, estabilidade térmica, viscosidade ajustável, poder de miscibilidade em água e solventes convencionais.⁶⁸

Dependendo da finalidade do uso, as propriedades físico-químicas dos líquidos iônicos podem ser ajustadas, a polaridade, viscosidade e hidrofobicidade podem ser determinadas escolhendo o constituinte aniônico ou catiônico.⁶⁸

Os líquidos iônicos possuem algumas propriedades interessantes, e por isso são utilizados como solventes verdes, aditivos e fases móveis na cromatografia.⁶⁸

3.6 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS - DES

Os líquidos iônicos e os DES são muito semelhantes, esse último além de ser considerado um solvente verde, apresenta uma outra vantagem, pois são mais baratos devido à ampla variedade de aplicações e facilidade de produção.¹⁷

Os DES são obtidos pela união de dois componentes: um aceitador de ligação de hidrogênio e um doador de vínculo, com ou sem aquecimento da mistura.¹⁴ Os DES podem ser formados por diversos componentes, tais como cloreto de colina, uréia, açúcares e ácidos orgânicos.^{69,70} Os DES estão sendo utilizados em diversas áreas, pois são considerados uma alternativa eficiente, uma vez que possuem propriedades químicas e físicas importantes, tais como baixa pressão de vapor, baixa combustibilidade, estabilidade térmica, toxicidade farmacêutica aceitável.^{18,19,20}

Os DES apresentam alta viscosidade em temperatura ambiente, e por este motivo não são considerados um bom solvente para a extração de compostos bioativos, e sim um aditivo no processo.¹³ Para melhorar o rendimento das extrações utilizando esses componentes são utilizados dois métodos: um inclui o uso dos DES em conjunto com solventes orgânicos, como por exemplo, o etanol, e o outro é o aumento de temperatura (até 80°C)⁷¹, aliando com micro-ondas ou ultrassom^{18,71} Zhang et al. (2014)⁵⁵ realizaram a extração de astaxantina de resíduos de camarão (cascas e cabeça) utilizando DES aliado com ultrassom, e de acordo com os autores, essa combinação foi eficaz na extração do carotenoide, aumentando assim o rendimento de 102 µg/g nas cascas e 158 µg/g nas cabeças, para 146 µg/g e 218 µg/g respectivamente. Hsieh et al. (2020)⁷² realizaram a extração de compostos ativos do gengibre utilizando diferentes tipos de DES em combinação com o ultrassom. De acordo com os autores, o desempenho desses compostos junto com o ultrassom foi capaz de extrair até 4mg/g de gingeróis, valor superior quando comparado ao uso apenas do solvente convencional.

A extração de compostos pode aumentar de 60 a 90% quando os DES são diluídos e a concentração ajustada, uma vez que irá equilibrar a viscosidade e a capacidade de extração da solução.⁷³ Para a extração de compostos oriundos de produtos naturais, os DES são considerados uma ótima alternativa, pois apresentam alta eficiência e rendimento, já que são capazes de aumentar o processo de transferência de massa.⁷⁴

Um componente amplamente utilizado na formação dos DES é o cloreto de colina, que é um composto biodegradável, não-tóxico e barato, pode ser usado com diferentes doadores de ligação de hidrogênio seguros e baratos, os quais podemos citar: uréia, glicerol, fontes renováveis de ácido carboxílico, ou polióis derivados de carboidratos para produzir solventes eutéticos.⁷⁵

Outro solvente convencional utilizado em muitas aplicações tanto na indústria alimentícia como farmacêutica é o glicerol,⁶⁷ que é um líquido viscoso e produzido em larga escala.⁶² Porém, o seu uso é limitado devido à baixa solubilidade em compostos orgânicos,⁷⁶ por esse motivo, diversos estudos tem sido realizados com o intuito de melhorar as propriedades físico-químicas do glicerol, o qual inclui o seu uso na preparação de DES como doador de ligação de hidrogênio.⁶⁷

A adição de adjuvantes em pequenas quantidades no processo de extração de compostos, é capaz de melhorar o resultado do rendimento.⁵⁷ Lee e Row (2016)¹³ realizaram a extração de astaxantina utilizando acetona e adjuvantes (DES e líquidos iônicos) no processo, os autores observaram que o rendimento foi aumentado pela adição desses adjuvantes, e o uso do DES na extração apresentou melhor desempenho.

Dai et al. (2013)²⁰ realizaram a extração de compostos fenólicos do açafraão utilizando diferentes tipos de DES e solventes convencionais. Os pesquisadores conseguiram recuperar os compostos fenólicos com um rendimento entre 75% e 97%, utilizando os DES quando comparado com o etanol.

O uso de DES é uma alternativa econômica na extração dos carotenoides oriundos dos resíduos de camarão, uma vez que são de fácil preparo, e não é necessário que haja etapas de purificação, além disso, é uma alternativa ambientalmente sustentável.^{13,14} Quando comparados com os métodos convencionais, podem ser facilmente preparados com elevada pureza e a um baixo custo.^{13,14,77}

3.7 ÉTICA E IMPORTANCIA SOCIAL

Os processos químicos causam impacto ambiental, isso mostrou a necessidade de investir em processos mais simples, sistemas que tenham baixo custo e ambientalmente sustentáveis.⁷⁸ A química verde tem por objetivo proteger o meio ambiente e a saúde humana de maneira econômica, isso está sendo alcançado

devido ao desenvolvimento de novas pesquisas utilizando produtos químicos seguros e solventes que são ambientalmente sustentáveis, além de desenvolvimento de matérias primas de fontes renováveis.⁷⁹

O aproveitamento dos resíduos de camarão para a recuperação de compostos que podem ser utilizados em diversas áreas utilizando química verde é de grande importância, uma vez que irá reduzir o impacto ambiental, já que esses compostos são desperdiçados à medida que os resíduos são eliminados. Além disso, esse trabalho também está de acordo com pelo menos 4 dos objetivos de Desenvolvimento Sustentável propostos pela ONU sendo eles:

- Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades;
- Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos;
- Conservar e promover o uso sustentável dos oceanos, mares e recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável;
- Fortalecer os mecanismos de implementação e revitalizar a parceria global para o desenvolvimento sustentável.

A utilização da astaxantina obtida por fonte natural visa a substituição de produtos sintéticos na indústria de alimentos, promovendo uma ingestão de alimentos mais saudáveis, baseada na sustentabilidade.

4. METODOLOGIA

Esta pesquisa trata-se de um estudo exploratório descritivo de caráter transversal.

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Os resíduos compostos por cascas e cefalotórax de camarão de cativeiro da espécie *Litopenaeus vannamei* foram obtidos da empresa Enseg Industria Alimentícia Ltda, localizada na cidade de Macaíba (RN), acondicionados em caixas térmicas e levados para o laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

O processo de higienização do resíduo de camarão foi realizado com água corrente, em seguida a amostra foi submetida a imersão em solução clorada a 220 ppm por 15 minutos, seguido de enxague em água corrente potável. Após isso, a amostra foi submetida ao processo de secagem a 70°C em estufa (TECNAL® TE 394/2) por 8 horas e, em seguida, foi triturada utilizando liquidificador doméstico (PHILIPS® WALITA) para a obtenção da farinha do resíduo de camarão que foi utilizada para a extração da astaxantina.⁸⁰

4.2 SÍNTESE DE DES E EXPERIMENTOS DE EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA

No sentido de recuperar a astaxantina da farinha de camarão, experimentos de extração por solventes foram realizados usando etanol como agente extratante e DES ou cloreto de colina como adjuvantes. Para a síntese do DES foi utilizado como doador de pontes de hidrogênio o glicerol, e como acceptor de pontes de hidrogênio o cloreto de colina (ISOFAR) nas proporções de 1:2.

Alíquotas de 0,2 g de farinha do resíduo de camarão foram colocadas em tubos de ensaio de 20mL e acrescida de 2 mL de fase líquida, cuja composição variou de 0% – 5% (m/v) de adjuvante. Em seguida, a amostra foi mantida a temperatura de 60°C em banho termostático ou banho ultrassom (SCHUSTER L-200, 150 W, 50/60Hz), por diferentes tempos de incubação (10, 30 e 50 minutos), protegidas da luz. Após essa etapa, a amostra foi submetida a centrifugação (centrífuga SOLAB® SL-706) a 6000 x g por 5 minutos, para posterior leitura em espectrofotômetro. Na

Tabela 1 estão descritas as diferentes concentrações do DES e cloreto de colina utilizadas.

Concentração de adjuvante (%m/v) (cloreto de colina ou DES)	Tempo no banho-maria e no banho ultrassônico (minutos)		
0%	10	30	50
1%	10	30	50
2%	10	30	50
5%	10	30	50

Tabela 1. Descrição das condições de tempo, temperatura e concentração de agente extratante para a obtenção da astaxantina.

4.3 REMOÇÃO DE CONTAMINANTES

Após a determinação da melhor condição de extração e com o objetivo de melhorar a qualidade do extrato, e diminuir os contaminantes da amostra por precipitação, foi adicionada a mesma uma solução de hidróxido de potássio (KOH) dissolvida em 10% (v/v) etanol, sob agitação, com a finalidade de ajustar o pH para 10. Após realizada esta etapa, o extrato foi submetido a temperatura 5°C por 150 minutos. Posteriormente, o pH foi ajustado para 7,0 com ácido clorídrico, conforme metodologia descrita por Hu et al. (2019).⁸¹

Após essa etapa a amostra foi concentrada 25 vezes em rotaevaporador (BUCHI® R-215) a 50°C por 120 minutos.

A análise estatística para determinação da melhor condição de extração foi realizada utilizando o software Statistica. Para comparar as diferentes formas de extração da astaxantina foi utilizado Análise de Variância com pós teste de Tukey, no qual foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Quantificação da astaxantina

4.4.1.1 Determinação de carotenoides totais

O teor de astaxantina extraída da farinha do resíduo de camarão foi, inicialmente determinado pelo espectrofotômetro, utilizando apenas etanol como branco. A leitura foi realizada em triplicata a 450 nm e o teor de astaxantina presente nas amostras foi expresso em termos de carotenoides totais usando a seguinte equação:

$$\text{Carotenoides (mg /g)} = A \times V \times D \times 100/E \times W$$

Equação 1: cálculo para obtenção do teor de carotenoides.⁸²

Onde: A = valor de absorbância a 450 nm, V = volume da fase líquida (em mL), D = fator de diluição usado, W = peso da farinha do resíduo utilizada e o E = coeficiente de extinção da astaxantina relatado por An et al. (1989)⁸³ (1% coeficiente de extinção = 2,100).

A astaxantina padrão (Sigma-Aldrich, EUA) foi dissolvida em etanol e utilizada para determinar o coeficiente de extinção (E) da astaxantina em λ_{max} , medida espectrofotometricamente à 450nm.

4.4.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise da astaxantina foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme descrito por Rao et al. (2013).⁴⁵ Os picos dos carotenoides foram confirmados por espectros específicos, segundo registrado pelo detector UV-visível. O HPLC (Shimadzu, Japão) equipado com detector UV-visível modelo SPD-10AV (Shimadzu, Japão) e coluna C18 de fase reversa (4,6 mm x 25 mm) com fase-móvel, contendo diclorometano: acetonitrila: metanol (20:70:10, v/v/v) sob condição isocrática e vazão de 1,0 mL/min a 450 nm foi utilizado para separar os carotenoides. Para a curva de calibração da astaxantina comercial, foram utilizadas concentrações de 0,05 até 30 $\mu\text{g/mL}$, e o resultado foi calculado conforme equação descrita abaixo:

$$\text{Astaxantina } (\mu\text{g/mL}): y = 132821x - 9565,6$$

Equação 2. Cálculo para obtenção do teor de astaxantina na amostra.

Onde, Y = área, X = concentração, R = 0,97.

4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA AMOSTRA

Para a determinação do perfil de ácidos graxos foi realizado uma esterificação para obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES), seguindo a metodologia descrita por Hartman e Lago.⁸⁴ A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos e a identificação pela biblioteca de banco de espectros de massas (NIST), utilizando um GCMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) no Laboratório de Combustíveis e Materiais (NPE-LACOM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)⁸⁵. A temperatura do injetor e do detector foram fixados em 230°C, a temperatura da coluna foi mantida em 90 °C e hélio foi adotado como gás transportador. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150°C (10 °C/min), 150 a 200 °C (2 °C/min), 200 a 230 °C (10 °C/min) em um tempo total de corrida de 39 minutos com um split de 100.

4.6. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER - FTIR

As análises de FTIR foram realizadas na Central Analítica no Instituto de Química da UFRN. Os materiais analisados foram: astaxantina padrão Sigma®, DES e extrato rico em astaxantina. Os mesmos foram homogeneizados juntamente a brometo de potássio (KBr), macerados e prensados para a obtenção de pastilhas. Posteriormente, foram registrados em transmitância e com região do infravermelho médio de 400 a 4000 cm⁻¹. Foi utilizado o espectrômetro da Shimadzu, modelo FTIR-8400S, série IRAFFINITY-1, software IRSOLUTION, versão 1.60, com número de varredura de 32 e resolução 4 cm⁻¹.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Atividade antioxidante por [2,2'-AZINO-BIS (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] - ABTS

A atividade antioxidante por ABTS foi determinada de acordo com método proposto por Re et al.⁸⁶ e Kuskoski et al.⁸⁷ com modificações. A amostra obtida na melhor condição de extração foi solubilizada na concentração de 10 mg/mL em etanol e diluições sucessivas (0,2 – 2,5 mM) foram realizadas. O radical ABTS foi obtido a partir da pesagem de quantidade especificada de ABTS e diluído em etanol até obtenção de absorvância $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

Em uma microplaca de acrílico com 96 poços, adicionou-se 20 μ L das soluções testes em octoplicata e 280 μ L do radical ABTS^{•+}. As absorvâncias foram medidas no leitor de microplacas (BiotekInstruments, EPOCHH, USA) a 734 nm. O percentual de sequestro do radical ABTS, foi determinado conforme descrito na equação 3.

$$\% \text{ Redução ABTS } \bullet + = 100 \times \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs do controle}}$$

Equação 3: cálculo para obtenção do % redução do ABTS^{•+}.

Em seguida, foi possível a obtenção de uma curva de regressão linear - % redução de ABTS por concentração da amostra) para que se fosse determinado a IC 50 ($y = 28,304x + 18,366$, $R = 0,952$). O controle, consistiu da leitura somente do radical ABTS.

4.7.2 Atividade antioxidante por sequestro do radical 1,1-diphenil-2-picrilhydrazil - DPPH

A atividade antioxidante por DPPH foi determinada de acordo com método proposto por Brand-Willians.⁸⁸ A amostra obtida na melhor condição de extração, assim como a astaxantina comercial, foram solubilizadas na concentração de 125 μ g/mL em etanol com o objetivo de verificar o percentual de inibição do radical. Em uma microplaca de acrílico com 96 poços, adicionou-se 40 μ L das soluções testes em octoplicata e 200 μ L de 60 mM DPPH. As absorvâncias foram lidas em leitor de

microplacas (BiotekInstruments, EPOCHH, USA) a 492nm. O percentual de redução do radical DPPH, foi determinado conforme descrito na equação 4. O controle, consistiu da absorbância apenas da solução de DPPH isoladamente.

$$\% \text{ Redução DPPH} = 100 \times \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs do controle}}$$

Equação 4: cálculo para obtenção do % redução do DPPH.

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste da atividade antimicrobiana se deu pela Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Atividade Moduladora, onde linhagens de bactérias multirresistentes foram cedidas gentilmente pelo laboratório da Universidade Regional do Cariri, as espécies *Pseudomonas auriginosa* 24 e *Staphylococcus aureus* 10 e *Escherichia coli* 06 foram usadas nos testes de atividade antimicrobiana do extrato de farinha de camarão.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em microplacas estéreis com 96 poços e foram diluídas seriadamente 1:1. As culturas em ágar mantidas em estoque foram repicadas e repassadas para caldo Cérebro Coração (Brain Heart Infusion - BHI) e incubadas a 37° C por 24 horas. Após esse período, foi preparado o meio de distribuição seriadamente 1:10, foram adicionados em eppendorfs 100 µL de meio BHI em 900µL de inóculo, e este meio de distribuição foi transferido para cada cavidade 100 µL.

Após esse processo, foi realizado a microdiluição da amostra obtida na melhor condição de extração, com concentração de 1024 µg/mL, sendo feita a diluição de 100 µL em octuplicata. Controles positivos (meio + inóculo) foram incluídos nos ensaios. As placas preenchidas foram incubadas a 35± 2°C por 24 horas.⁸⁹

Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma-Aldrich, USA) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (m/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em

temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa, devido à redução da resazurina, indica o crescimento bacteriano^{90,91} a CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

Para verificar a ação da astaxantina e compostos majoritários como moduladores da ação antibiótica, a CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (gentamicina), fluoroquinolonas (norfloxacino), ambos padrão Sigma-Aldrich, foi avaliada na presença e na ausência da astaxantina comercial e a obtida no trabalho em microplacas estéreis.⁹²

Os resultados foram expressos em termos de média aritmética e desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste post-hoc Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism e as diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS POR EXTRAÇÃO DE FARINHA DO RESÍDUO DE CAMARÃO

A extração sólido-líquido é bastante utilizada para recuperar a astaxantina, porém para que a extração ocorra de maneira eficiente é necessário que a proporção solvente-amostra seja bem definida. De acordo com Zhang et al. (2014),⁵⁵ volumes maiores de solvente podem afetar a eficiência da extração, diminuindo a viabilidade. A Figura 3 mostra os resultados das extrações nas diferentes concentrações de agente extratante, tempo de exposição, temperatura e presença/ausência de ultrassom.

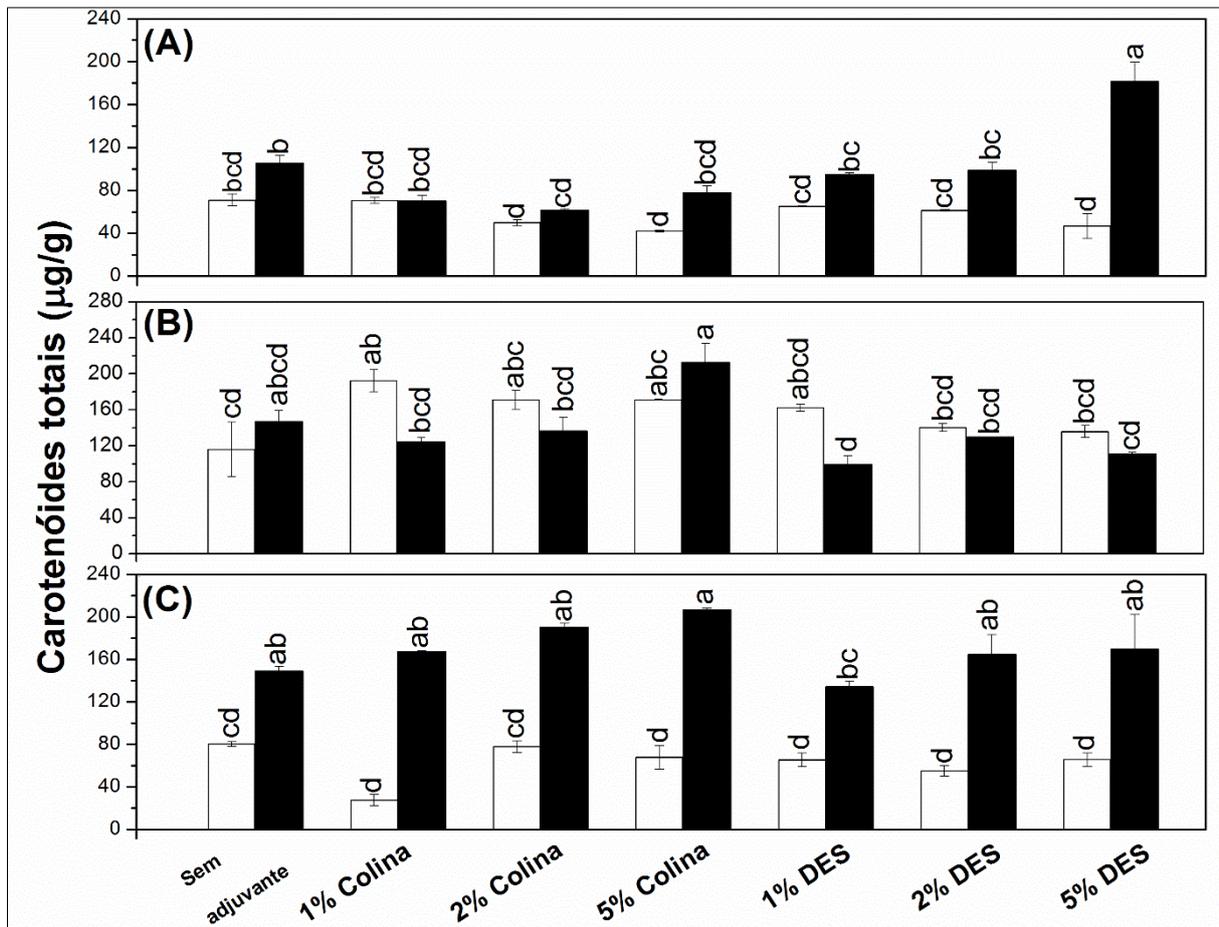


Figura 3. Rendimento da extração de carotenoides totais (mg/g) da farinha do resíduo de camarão no banho-maria (barras brancas) e no banho ultrassônico (barras pretas) a 60°C. (A) 10 minutos. (B) 30 minutos. (C) 50 minutos. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste de Análise de Variância-ANOVA seguido de pós teste de Tukey. Resultados com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas 95% de confiança ($p > 0,05$).

Após a avaliação de todas as condições utilizadas durante a extração, foi possível perceber que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparada a extração com e sem o ultrassom em todas as condições de concentração de DES e tempo de aquecimento.

No tempo de exposição de 10 minutos sem o ultrassom, a adição de adjuvante foi prejudicial para a recuperação dos carotenoides totais. Usando 5% (m/v) de DES, a concentração de carotenoides totais foi 35% inferior àquela obtida das extrações apenas com etanol.

O ultrassom apresenta efeito de cavitação, levando à ruptura celular, o que pode facilitar a recuperação dos carotenoides.⁵⁸ Outro fator que contribui para aumentar o rendimento das extrações é a redução no tamanho das partículas do material sólido, causada pelas energia do ultrassom, aumentando a área de superfície de contato da fase sólida com o solvente.⁵⁹ Dessa forma, essa tecnologia é capaz de aumentar o rendimento dos compostos com menores tempos de extração, volumes de solventes e consumo de energia.⁵⁹

A eficiência de extração dos carotenoides depende do solvente utilizado, polaridade e da capacidade de solubilidade do composto no solvente.⁹³ Estudo realizado por Bi et al. (2010)⁹⁴ mostrou que o etanol é o melhor solvente para extração de astaxantina dos resíduos de camarão.

O uso de DES é eficiente na extração de astaxantina,¹⁷ no presente trabalho, o etanol foi utilizado em conjunto com o DES como aditivo na extração da astaxantina da farinha do resíduo de camarão.

A partir dos resultados da Figura 3, podemos perceber que as melhores condições foram: extração utilizando etanol por 30 minutos, extração utilizando cloreto de colina a 5% (m/v) por 30 minutos, e a extração utilizando DES a 5% (m/v) por 30 minutos. Com relação ao uso do ultrassom, foi possível perceber que no tempo de 50 minutos, em todas as condições de aditivo, a eficiência de extração foi diminuída. Para facilitar a discussão, foi feito o teste estatístico com o objetivo de avaliar qual a melhor condição de extração e quais os efeitos que estariam interferindo nessa extração.

5.2 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

A partir dos melhores resultados obtidos na Figura 2 foram realizadas as análises estatísticas para verificar as variáveis que interferem na extração da astaxantina.

Amostra	10 minutos		30 minutos		50 minutos	
	A	B	A	B	A	B
Etanol	70,95±5,55	105,39±7,30	115,71±30,31	147,14±12,22	80,15±2,38	148,73±4,28
5% Colina	42,06±0,79	77,93±6,19	171,26±0,15	213,01±20,31	67,61±10,79	206,82±1,42
5% DES	46,66±11,42	181,58±17,77	135,71±6,50	111,11±1,26	65,55±6,19	169,68±32,22

Tabela 2. Valores de equivalentes de astaxantina ($\mu\text{g/g}$) encontrados nas extrações. Valores expressos por média (desvio padrão). A = sem ultrassom, B = com ultrassom. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste de Análise de Variância-ANOVA seguido de pós teste de Tukey.

Conforme descrito na Figura 4, o tempo de exposição e a relação do tempo com o solvente, do tempo com o ultrassom, e do tempo com o solvente e o ultrassom, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o que é indicativo que esses fatores influenciam diretamente na quantidade de carotenoides extraída.

Handayane et al. (2008)⁹⁵ realizaram a extração da astaxantina dos resíduos de camarão utilizando óleo de palma em diferentes condições de temperatura (30 a 90°C). De acordo com os autores, temperaturas entre 30 e 70°C são capazes de manter a extração da astaxantina estável, apresentando os melhores resultados.

Molino et al. (2018)⁹⁶ realizaram a extração de astaxantina de algas marinhas usando etanol como co-solvente pela técnica de fluido supercrítico, em diferentes parâmetros de tempo, temperatura e pressão. A temperatura de 65°C foi considerada a melhor para a extração desse carotenoide.

A temperatura exerce papel crucial na extração e degradação desse carotenoide, afetando assim o rendimento da extração.⁹⁶ Quanto maior a temperatura, maior o processo de transferência de massa, porém, temperaturas elevadas poderão degradar os compostos bioativos.⁵⁷ No presente estudo, a temperatura de 60°C foi utilizada pensando tanto na temperatura considerada ótima de extração da astaxantina, como a ideal para o uso dos DES. A capacidade de extração pode ser atribuída às ligações de hidrogênio do DES com os compostos bioativos.²⁰

Troter et al. (2017),⁹⁷ mostraram que à medida que a temperatura aumenta ocorre a diminuição da densidade, viscosidade e índice de refração, enquanto que a condutividade elétrica dos DES aumenta.

Em um estudo feito por Hu et al. (2019),⁸¹ o qual realizou a extração da astaxantina dos resíduos de camarão com diferentes condições (relação sólido-líquido, temperatura e tempo de extração), mostrou que a temperatura foi o fator mais importante do processo de extração.

Sanchez-Silva et al. (2012)⁹⁸ testaram a otimização de alguns parâmetros para a extração de astaxantina, e constataram que a agitação em vortex, seguido do banho ultrassônico foi considerado o melhor procedimento de extração. O uso do ultrassom é capaz de aumentar o contato entre o solvente e a amostra, uma vez que, é capaz de fragmentar e causar a erosão do resíduo, e conseqüentemente das células, aumentando assim o maior contato da amostra com o solvente para maior capacidade de extração.⁵⁵

O maior tempo de contato com o ultrassom pode levar a formação e acúmulo de radicais durante o processo de cavitação, o que acarreta na degradação dos compostos carotenoides.⁹⁹ Isso pode explicar o fato de o DES na concentração de 5% (m/v) ter tido sua eficiência diminuída no maior tempo de exposição (50 minutos), quando comparado com a mesma condição, no tempo de 30 minutos.

No estudo realizado por Lee e Row (2016)¹³ a quantidade de astaxantina extraída aumentava a medida que o tempo aumentou, após 90 minutos, essa quantidade extraída foi reduzida. De acordo com os autores, tempos de extração maiores aumentam o contato do carotenoide com a luz e oxigênio, promovendo a isomerização da astaxantina.

A Figura 3 mostra que independentemente do tempo e do solvente utilizados, o ultrassom é capaz de aumentar a extração da astaxantina, otimizando assim o processo e reduzindo o tempo de extração ($p < 0,05$). Quanto maior o tempo de exposição ao ultrassom, mais astaxantina é extraída, o que é indicativo de que esse método melhora a extração dos carotenoides da farinha do resíduo de camarão. Sem o ultrassom, o tempo de 30 minutos apresentou melhores resultados de extração.

Lee e Row (2016)¹³ realizaram a extração de astaxantina utilizando o ultrassom. De acordo com os autores, à medida que a potência do ultrassom foi aumentada, mais astaxantina foi extraída.

Em extrações convencionais, geralmente são utilizadas altas temperaturas, porém, na extração assistida por ultrassom, isso não é necessário, o que é interessante para a extração de compostos sensíveis ao calor.⁵⁹ Dessa forma, é possível perceber que, quando há a combinação de tempo e temperatura, juntamente com o ultrassom, a eficiência de extração da astaxantina é aumentada. O menor tempo de exposição (10 minutos) em combinação com o DES foi suficiente para se obter uma maior concentração de astaxantina.

Em um estudo realizado por Molino et al. (2018),⁹⁶ o tempo de 20 minutos foi suficiente para extrair a astaxantina de microalgas. No presente trabalho, os melhores resultados de obtenção de astaxantina de acordo com a análise realizada foram Etanol por 30 minutos, 5% de DES por 10 minutos, e 5% de cloreto de colina por 30 minutos, todos em banho ultrassônico (Tabela 3).

Fator	Ultrassom	Tempo (min)	Concentração de carotenoides totais (µg/g)
ETANOL+COL5%	Sim	30	213,01 ^a
ETANOL+COL5%	Sim	50	206,82 ^{ab}
ETANOL+DES5%	Sim	10	181,58 ^{abc}
ETANOL+COL5%	Não	30	171,26 ^{abc}
ETANOL+DES5%	Sim	50	168,68 ^{abc}
ETANOL	Sim	50	148,73 ^{abcd}
ETANOL	Sim	30	147,14 ^{abcde}
ETANOL+DES5%	Não	30	135,71 ^{bcdef}
ETANOL	Não	30	115,71 ^{cdefg}
ETANOL+DES5%	Sim	30	111,11 ^{cdefg}
ETANOL	Sim	10	105,39 ^{cdefg}
ETANOL	Não	50	80,15 ^{defg}
ETANOL+COL5%	Sim	10	77,93 ^{defg}
ETANOL	Não	10	70,95 ^{efg}
ETANOL+COL5%	Não	50	67,61 ^{fg}
ETANOL+DES5%	Não	50	65,55 ^{fg}
ETANOL+DES5%	Não	10	46,66 ^g
ETANOL+COL5%	Não	10	42,06 ^g

Tabela 3. Comparação do resultado da quantidade de astaxantina extraída da farinha do resíduo de camarão, sob as diferentes condições testadas. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Resultados com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas 95% de confiança ($p > 0,05$).

A partir desses dados as amostras foram submetidas a análise em HPLC para quantificação da astaxantina e determinação da melhor condição de extração.

5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

As amostras extraídas na melhor condição, para cada solvente, foram avaliadas quanto a concentração de astaxantina. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

Condição	Astaxantina ($\mu\text{g/g}$)
Etanol – 30 minutos	$30,99 \pm 0,52^a$
5% DES – 10 minutos	$32,71 \pm 0,72^a$
5% COLINA – 30 minutos	$23,73 \pm 1,50^b$

Tabela 4. Resultado da quantidade de astaxantina extraída da farinha do resíduo de camarão de acordo com a análise de CLAE. Teste ANOVA com pós-teste de Tukey. Resultados com a mesma letra não apresentam diferenças estatísticas 95% de confiança ($p > 0,05$).

De acordo com os resultados, escolhemos a condição de 5% (m/v) de DES por 10 minutos, uma vez que foi o que necessitou de menor tempo de extração de astaxantina da farinha do resíduo de camarão. O resultado obtido foi de $32,71 \mu\text{g/g}$ de astaxantina utilizando o DES como adjuvante no processo de extração. Esse valor apesar de não diferir estatisticamente da condição de extração sem adjuvante, foi escolhido pelo menor tempo de exposição a temperatura, e assim mais eficiência no tempo de extração, com economia de tempo e recursos (energia).

De acordo com Lee e Row (2016),¹³ uma quantidade maior de DES utilizado no processo de extração pode diminuir o rendimento da astaxantina extraída de plantas marinhas. De acordo com os autores, em temperatura ambiente, os DES apresentam alta viscosidade, o que pode limitar o uso na extração de produtos naturais. Porém, no presente trabalho isto não ocorreu, pois, o DES foi utilizado apenas como adjuvante.

Cui et al. (2015)¹⁰⁰ desenvolveram um método utilizando DES aliado a micro-ondas para extrair compostos bioativos de raízes de ervilha. De acordo com os autores esse método foi capaz de aumentar a solubilidade dos compostos, aumentando a eficiência de extração (otimização do tempo), e conseqüentemente o rendimento.

Em um estudo realizado por Bubalo et al. (2016)¹⁰¹ os autores extraíram compostos fenólicos da casca de uva utilizando DES e solventes convencionais associados ao ultrassom e micro-ondas. De acordo com os autores, o uso do DES mostrou-se eficiente na extração desses compostos em comparação aos solventes convencionais, corroborando com os achados do presente estudo. Peng et al. (2015)¹⁰² realizaram a extração de compostos fenólicos da flor *Lonicerae japonicae* utilizando DES, e os autores concluíram que esses solventes mostraram efeitos positivos na extração dos compostos.

O declínio do rendimento da extração de astaxantina no maior tempo de extração (50 minutos), pode ter sido devido à quebra de ligações entre o DES e o etanol, havendo assim o desbalanceamento na polaridade, e conseqüentemente, menor desempenho na extração.⁹⁴

Utilizando a melhor condição de extração (5% DES sob 60°C com ultrassom por 10 minutos) a amostra foi concentrada em rotaevaporador para retirada do etanol e a concentração da astaxantina foi de 44,35 µg/g de farinha do resíduo de camarão. Esse resultado foi superior aos valores encontrados em outros trabalhos conforme descrito abaixo.

Na tentativa de diminuir os contaminantes dessa amostra para a realização dos testes de atividade antioxidante e antimicrobiana, foi realizada a adição da solução contendo hidróxido de potássio afim de modificar o pH do extrato, e assim causar a precipitação da quitina. O extrato foi submetido a leitura em CLAE antes e após a evaporação. Logo após a etapa de modificação do pH o resultado da astaxantina foi de 11,47 µg/g de farinha do resíduo, após a concentração, esse resultado passou a ser de 22,82 µg/g.

De acordo com Delgado et al. (2016)³⁶ ácidos e bases promovem a isomerização das ligações duplas, e assim promovem a esterificação da astaxantina. Em pH 4,0 a astaxantina se mantém mais estável, porém quando ocorre a modificação do pH para valores acima de 7,0 a concentração desse carotenoide diminui em 60%.¹⁰³

Na Figura 4 estão descritos os resultados dos perfis cromatográficos, onde podemos perceber que, a astaxantina extraída dos resíduos de camarão quando comparada com a astaxantina sintética apresentou o mesmo pico e no mesmo tempo de extração (2,4 minutos), comprovando que o carotenoide extraído da farinha dos resíduos de camarão é astaxantina.

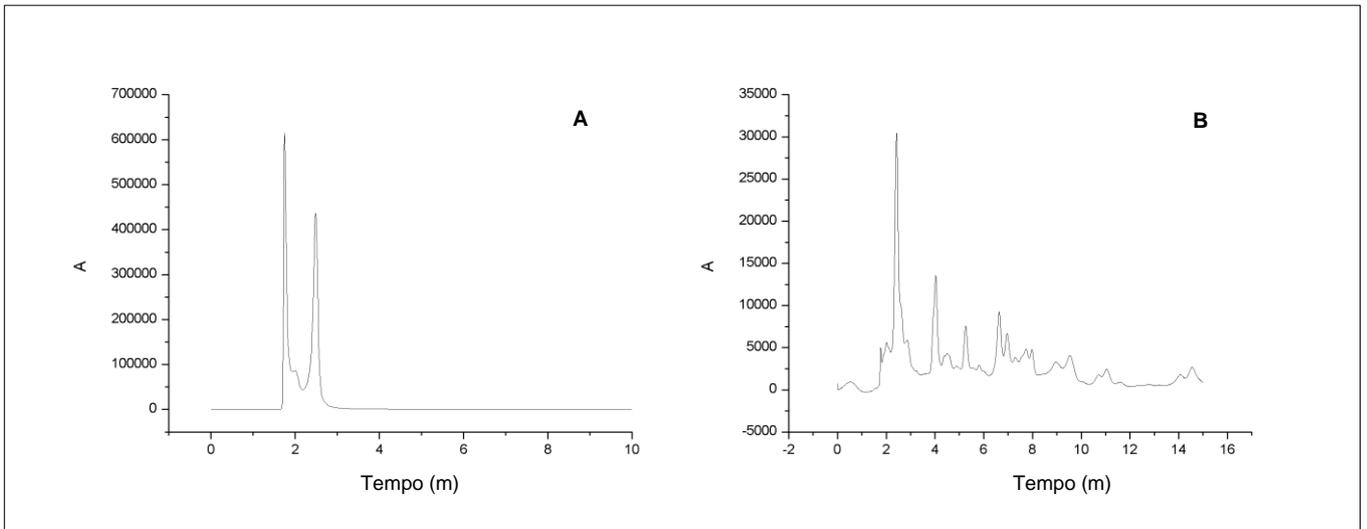


Figura 4. Perfis cromatográficos do HPLC. A – astaxantina sintética, B – extrato rico em astaxantina.

Apesar desse valor ter sido menor ($22,82 \mu\text{g/g}$), a qualidade do extrato foi superior, e mostrou melhores resultados na realização dos testes posteriores. Por este motivo, adotamos essa metodologia para a realização dos testes antioxidantes, antimicrobiano.

Sanchez-Silva et al. (2013)⁹⁸ realizaram a extração de astaxantina a partir de resíduos de camarão utilizando metanol como solvente e banho ultrassônico por 10 minutos. Os autores avaliaram a quantidade do carotenoide presente na cabeça, cefalotórax e carne do camarão, e obtiveram respectivamente, $22,1$, $16,4$ e $3,8 \mu\text{g/g}$ de astaxantina.

Radzali et al. (2014)¹⁰⁴ conseguiram obter $12,25 \mu\text{g/g}$ de astaxantina utilizando na extração etanol e metanol em diferentes condições. Em um estudo feito por Irna et al. (2017)¹⁰⁵, foi realizada a extração de astaxantina de diferentes espécies de camarão por duas técnicas diferentes sem aumento da temperatura (extração química e processamento de alta pressão utilizando metanol e acetona). O método mais promissor, de acordo com os autores, foi capaz de extrair $59,97 \mu\text{g/g}$ de astaxantina, resultado superior ao obtido no presente estudo. Porém, ao comparar com a presente pesquisa, o estudo utilizou solventes convencionais e potencialmente tóxicos.

Hu et al. (2019)⁸¹ testaram diferentes condições para extração de astaxantina com o intuito de descobrir a melhor condição de extração desse

carotenoide. Os autores concluíram que, o etanol foi considerado o melhor solvente, a temperatura ideal foi de 50°C, e o tempo de extração de 20 minutos, com essas condições, o rendimento da astaxantina extraída foi de 43,7 µg/g.

Em um estudo realizado por Corrêa et al. (2012),²⁶ os autores utilizaram o etanol como solvente no processo de extração da astaxantina por fluido supercrítico, os autores conseguiram obter o rendimento de 32 mg/kg do carotenoide.

5.4 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR

Os espectros do FTIR fornecem informações que facilitam a identificação da presença de certas funções, grupos ou ligações químicas em moléculas ou sistemas de interação.¹⁰⁶ Essa análise foi utilizada para confirmar a presença de astaxantina no extrato obtido da farinha do resíduo de camarão.

O resultado do FTIR está representado na Figura 5, onde podemos perceber que as bandas vibracionais características à astaxantina comercial, tais como a deformação do grupo metil (1047 cm^{-1}) e o alongamento da ligação OH (3323 cm^{-1})¹⁰⁷ são observados no extrato da farinha de camarão.

Leves semelhanças também são observadas entre a amostra DES e o extrato da farinha de camarão, especialmente na banda vibracional COO do cloreto de colina observado no comprimento de onda 957 cm^{-1} , o que é indicativo de que o extrato continha as características desse composto.¹⁰⁸

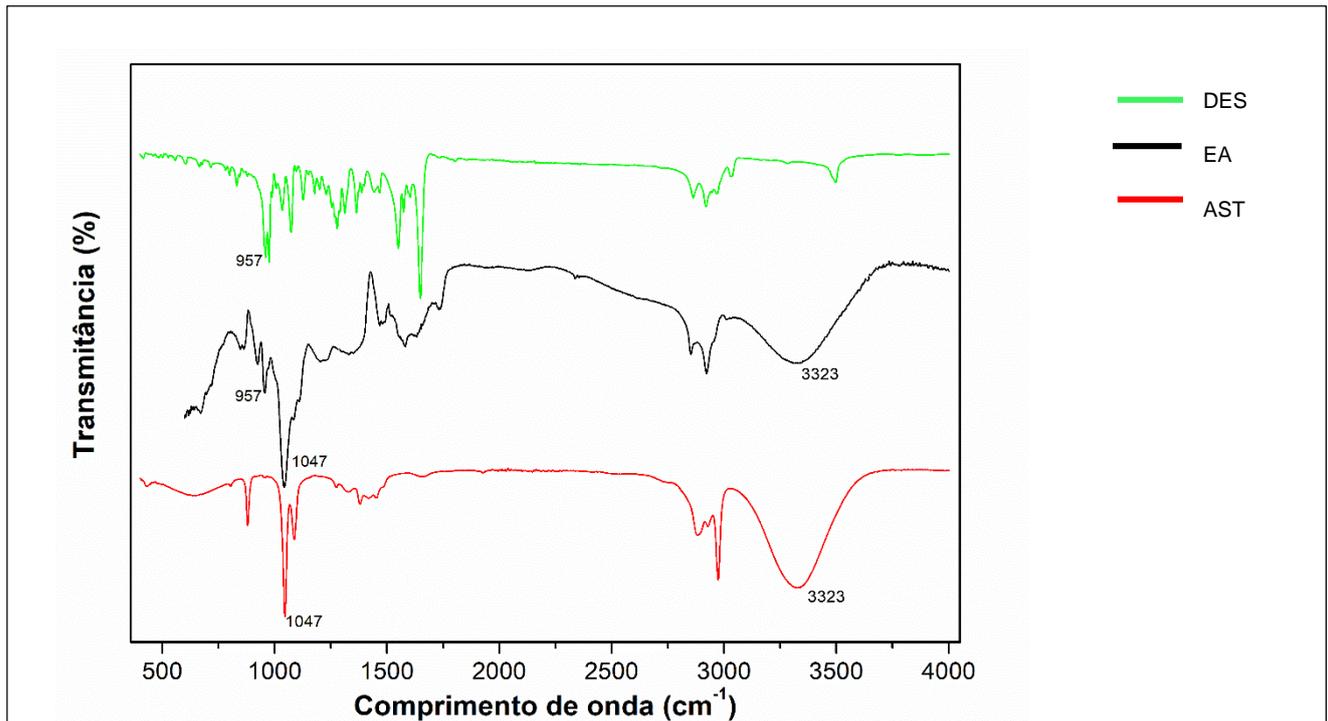


Figura 5. Resultado do FTIR. EA – extrato rico em astaxantina, DES – solvente eutético profundo, AST – astaxantina sintética.

5.5 PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS

A astaxantina dependendo da sua origem, pode ser encontrada em sua forma livre, ou em associação com outros compostos, como por exemplo, os ácidos graxos.⁴⁹ Os resultados da esterificação dos ácidos graxos estão descritos na Tabela 5.

Ácido graxo	Etanol – 30 minutos (%)	5% DES – 10 minutos (%)	5% Colina – 30 minutos (%)
Ácidos graxos saturados	35,70	35,23	33,6
Ácido graxo monoinsaturado	27,94	30,98	41,32
Ácido graxo poli-insaturado	36,36	33,79	25,08
Total	100	100	100

Tabela 5. Resultado da esterificação dos ácidos graxos.

Como pode ser visto na tabela, nas três diferentes condições de extração houve uma variação nos resultados, o que é indicativo que o tempo de extração, assim como o aditivo utilizado interferem nesse resultado. A condição de extração utilizando 5% de DES por 10 minutos foi a que apresentou melhor resultado de ácidos graxos saturados e poli-insaturados, assim como a condição utilizando 5% de colina por 30 minutos. Porém, devido ao fato da primeira condição citada ser realizada em menos tempo, há uma maior agilidade no processo, e conseqüentemente menor consumo de energia.

No presente estudo foi possível perceber que, o DES, assim como o tempo de extração empregado também influenciaram no teor de ácidos graxos da amostra, e que apesar disso, a condição de extração escolhida pode ser considerada uma boa fonte de ácidos graxos poli-insaturados.

Sabe-se que os animais marinhos são ricos em ácidos graxos poli-insaturados, e que esses estão envolvidos com proteínas reguladoras, e em inúmeros processos, entre eles na permeabilidade das membranas, regulam a expressão de alguns genes, exercem ainda benefícios sobre sistema cardiovascular, como por exemplo diminuição nos níveis de triglicérides e LDL, aumento do HDL, e previne a aterosclerose.¹⁰⁹ Sabendo disso, é notório os benefícios da ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados tendo em vista os benefícios para a saúde humana em decorrência da ingestão desses compostos.

Gómez-Estaca et al. (2017)¹¹⁰ realizaram a extração de astaxantina de camarões da espécie *L. vannamei* e analisaram o perfil dos ácidos graxos da amostra cinco vezes no período de 120 dias. Os ácidos graxos mais abundantes foram: ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2n6c), ácido oleico (C18:1n9c), ácido docosaexanoico-DHA (C22:6n3) e ácido eicosapentenoico-EPA (C20:5n3), o que corrobora com os dados da presente pesquisa.

Amiguet et al. (2012)³ realizaram a extração de ácidos graxos dos resíduos de camarões da espécie *Pandalus borealis* utilizando acetona e hexano como solventes. Os resultados mostraram que os ácidos graxos mais presentes foram os poli-insaturados, e os autores observaram que o teor de ácidos graxos variou de acordo com o solvente o utilizado.

5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ASTAXANTINA RECUPERADA

A astaxantina utilizada na indústria é de origem sintética, devido à preocupação com a segurança alimentar, e sabendo dos malefícios do uso de substâncias sintéticas, formas naturais de extração desse pigmento estão sendo buscadas.³²

O teste de eliminação do radical ABTS é baseado na capacidade do antioxidante testado em reduzir o radical pré-formado, causando alterações na cor inicial do radical.¹¹¹

No presente trabalho, a astaxantina extraída dos resíduos de camarão utilizando o DES mostrou atividade de eliminação do radical ABTS com o valor de 1,18 mM, não foi possível determinar o IC₅₀ da astaxantina sintética. Os valores obtidos nesse trabalho mostram que a atividade antioxidante da astaxantina extraída com o DES foi menor quando comparada ao trabalho de Liu et al. (2016)¹¹² que realizaram os mesmos testes antioxidantes com diferentes isômeros de astaxantina, obtendo valores de IC₅₀ de eliminação do radical ABTS entre 39,02 e 44,86 µM.

Com relação ao radical DPPH (Tabela 6), o extrato rico em astaxantina obtido apresentou um percentual de inibição de 22,65%, dados semelhantes a esses foram encontrados por Liu et al. (2016)¹¹² que obtiveram valores de percentual de inibição entre 23,70% e 24,12% utilizando a concentração de 100 µg/mL. Pode-se perceber que a astaxantina extraída com o DES apresentou potencial antioxidante, mostrando assim que o método de extração não interferiu na atividade biológica da molécula.

Amostra	DPPH (%)
Astaxantina sintética (125 µg/mL)	13,16 ± 3,35 ^a
Astaxantina extraída (125 µg/mL)	22,65 ± 2,90 ^b

Tabela 6. Resultado da atividade antioxidante por eliminação do radical DPPH. Os valores são comparados entre si por meio de análise de variância com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

A astaxantina é capaz de reduzir e/ou eliminar os radicais livres devido a sua estrutura química,¹¹³ é considerada o melhor dos carotenoides presentes naturalmente nos alimentos devido a sua capacidade de proteção contra os radicais

livres,⁸ e as suas propriedades podem sofrer variação dependendo da origem, forma de extração, tratamento e purificação.²⁴

A astaxantina sintética é uma molécula semelhante a que é produzida por organismos vivos, e está sendo utilizada em larga escala.⁴⁹ Com a demanda crescente por produtos naturais, e o alto custo para a produção desse pigmento sintético, tem-se intensificado as pesquisas para extração desse composto oriundo de fontes naturais.⁴⁹ O uso desses resíduos industriais para a extração de pigmentos antioxidantes são mais seguros quando comparados ao uso dos corantes sintéticos.^{55,29}

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para essa análise foi realizado o teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Atividade Moduladora. Foram escolhidas bactérias gram-positivas e gram-negativas multirresistentes com o intuito de analisar o efeito da astaxantina extraída nesses dois tipos de microrganismos. A atividade antibacteriana mostrou efeito inibitório significativo na concentração mínima de 1024µg/mL.

Os resultados da CIM e atividade moduladora estão representados na Figura 6. Pode-se perceber que a astaxantina padrão Sigma® mostrou uma atividade de sinergismo com os dois medicamentos frente a *S.aureus*. Com relação a *E. coli* apresentou sinergismo com a gentamicina e antagonismo com a norfloxacino.

Na Figura 6 B o extrato de astaxantina quando utilizado em conjunto com o Norfloxacino e Gentamicina foi capaz de diminuir a quantidade de antibiótico necessária para inibir as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* que são gram-negativas.

Quando comparada a atividade do extrato testado e da astaxantina padrão frente aos medicamentos e ao microrganismo *P. aeruginosa* é possível perceber atividade semelhante.

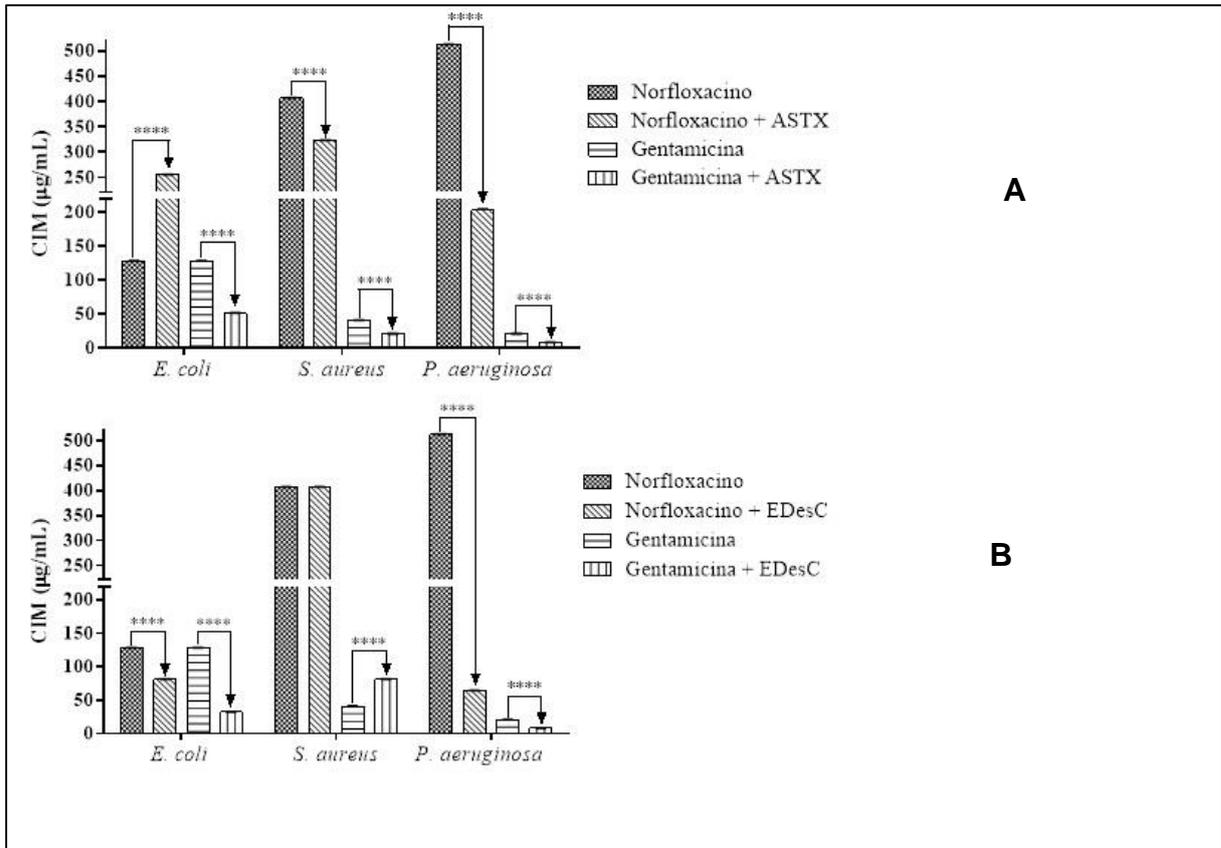


Figura 6. Valores de Concentração Inibitória Mínima encontrados. A = Resultado do teste realizado com a astaxantina padrão Sigma®, B = Resultado do teste realizado com o extrato rico em astaxantina. ASTX = astaxantina comercial, EDesC = extrato rico em astaxantina. ****Valor estatisticamente significativo ($p < 0,0001$).

As bactérias gram-negativas possuem em sua parede celular uma maior quantidade de lipídeos, tendo assim característica apolar e lipofílica.¹¹⁴ A molécula de astaxantina também apresenta essa característica, isso pode explicar a maior interação que ocorreu entre o extrato associado com os medicamentos, pois a astaxantina conseguiu atravessar de forma mais eficiente a parede celular, diminuindo assim a quantidade necessária para a CIM. Os medicamentos Gentamicina e norfloxacin atuam na síntese do DNA das bactérias, e inibe a síntese proteica respectivamente, isso é indicativo que devido a capacidade de ligação da astaxantina nas membranas celulares, ela é capaz de agir diretamente no núcleo celular de bactérias pertencentes a este grupo.

Com relação ao microrganismo *S. aureus*, o extrato aliado com o Norfloxacin não apresentou nenhum efeito, porém quando o extrato foi utilizado juntamente com a Gentamicina apresentou antagonismo, ou seja, foi necessária uma quantidade maior do medicamento para inibir essa bactéria. Isso também pode ser

explicado pela estrutura da parede celular desse microrganismo, que é uma bactéria gram-positiva que tem característica polar,¹¹⁴ o que dificulta a ligação da molécula da astaxantina.

De acordo com Ushakumari e Ramanujan (2013)¹¹⁵ a astaxantina é eficaz tanto para bactérias gram-positivas como gram-negativas. Um estudo utilizou polímeros a base de astaxantina para avaliar a capacidade como agente antimicrobiano frente aos microrganismos *S. aureus* e *S. epidermidis*, e de acordo com os autores, o polímero de astaxantina foi capaz de reduzir o crescimento microbiano e inibir a formação de biofilme.¹¹⁶

Em um trabalho realizado por Coronel (2016)¹¹⁷ utilizando o extrato da microalga *Haematococcus pluvialis* fonte de astaxantina, foi mostrado que o extrato foi capaz de inibir nove espécies de bactérias, mostrando ser o mais eficiente quando comparado a outros, no mesmo estudo.

Os resultados desse teste mostraram que a astaxantina extraída apresenta resultados semelhantes a astaxantina padrão, o que é indicativo de que o método de extração não interferiu nas características do carotenoide.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento desse trabalho permitiu propor uma estratégia de recuperação de astaxantina utilizando resíduo do camarão (*Litopenaeus vanamei*) onde para cada grama de farinha do resíduo foi possível obter valores de até 44,35µg de astaxantina, indicando que a estratégia de extração com etanol utilizando DES como aditivo na concentração de 5% (v/v), sob temperatura de 60°C e ultrassom foi eficiente.

As análises físico químicas da astaxantina mostraram que a extração com o DES não alterou suas propriedades. Ao comparar a astaxantina extraída com a astaxantina sintética, os testes mostraram que as atividades antioxidante e antimicrobiana foram semelhantes.

O aproveitamento dos resíduos de camarão para a extração de astaxantina por química verde é de grande importância, uma vez que é capaz de realizar todo o processo de extração de forma eficaz e sem comprometer as propriedades desse carotenoide, reduzindo o impacto ambiental gerado pelos resíduos das indústrias da carcinicultura.

REFERÊNCIAS

1. Rocha IP. Carcinicultura brasileira: processos tecnológicos, impactos sócio-econômicos, sustentabilidade ambiental, entraves e oportunidades. 2010;(1):10.
2. Núñez-Gastélum JA, Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Paseiro-Losada P, Sendón R, Sanches-Silva AT, et al. Evaluación físico-química de aceite pigmentado obtenido de la cabeza de camarón. *Grasas y Aceites*. 2011;62(3):321–7.
3. Amiguet VT, Kramp KL, Mao J, McRae C, Goulah A, Kimpe LE, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of polyunsaturated fatty acids from Northern shrimp (*Pandalus borealis* Kreyer) processing by-products. *Food Chem [Internet]*. 2012;130(4):853–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.098>
4. Seabra LMAJ, Damasceno KSFSC, Silva CR, Gomes CC, Pedrosa LFC. Carotenoides totais em resíduos do camarão *litopenaeus vannamei*. *Rev Ceres*. 2014;61(1):130–3.
5. Takeungwongtrakul S, Benjakul S, Santoso J, Trilaksani W, Nurilmala M. Extraction and stability of carotenoid-containing lipids from hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Food Process Preserv*. 2015;39(1):10–8.
6. Assis AS, Stamford TCM, Stamford TLM. Bioconversão De Resíduos De Camarão *Litopenaeus Vannamei* (Booner, 1931) Para Produção De Biofilme De Quitosana. *Rev Iberoam Polímeros Vol Iberoam Polim [Internet]*. 2008;9(95):480–99. Available from: <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/OCT08/sales.pdf>
7. Sachindra NM, Bhaskar N, Mahendrakar NS. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *J Sci Food Agric*. 2005;85(1):167–72.
8. Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources,

- extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Mar Drugs*. 2014;12(1):128–52.
9. Kajita M, Tsukahara H, Kato M. The Effects of a Dietary Supplement Containing Astaxanthin on the Accommodation Function of the Eye in Middle-aged and Older People. *Transl from Med Consult New Remedies*. 2009;46(3).
 10. Zhao T, Yan X, Sun L, Yang T, Hu X, He Z, et al. Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2019;91(April):354–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.014>
 11. Franco-Zavaleta ME, Jiménez-Pichardo R, Tomasini-Campocosio A, Guerrero-Legarreta I. Astaxanthin extraction from shrimp wastes and its stability in 2 model systems. *J Food Sci*. 2010;75(5):394–9.
 12. Damasceno KSFSC, Andrade SAC, Stamford TLMS. Aproveitamento do resíduo de camarão. *Bol Cent Pesqui Process Aliment*. 2009;27(2):213–24.
 13. Lee YR, Row KH. Comparison of ionic liquids and deep eutectic solvents as additives for the ultrasonic extraction of astaxanthin from marine plants. *J Ind Eng Chem* [Internet]. 2016;39:87–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.05.014>
 14. Pena-Pereira F, Namieśnik J. Ionic liquids and deep eutectic mixtures: Sustainable solvents for extraction processes. *ChemSusChem*. 2014;7(7):1784–800.
 15. Kidd P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. *Altern Med Rev*. 2011;16(4):355–64.
 16. Saini RK, Moon SH, Keum YS. An updated review on use of tomato pomace and crustacean processing waste to recover commercially vital carotenoids. *Food Res Int* [Internet]. 2018;108(April):516–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.003>
 17. Lee YR, Row KH. Comparison of ionic liquids and deep eutectic solvents as additives for the ultrasonic extraction of astaxanthin from marine plants. *J Ind*

- Eng Chem [Internet]. 2016;39:87–92. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.05.014>
18. Witkamp G-J, Choi YH, Dai Y, van Spronsen J, Verpoorte R. Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents in Natural Products Research: Mixtures of Solids as Extraction Solvents. *J Nat Prod*. 2013;76(11):2162–73.
 19. Earle MJ, Esperança JMSS, Gilea MA, Lopes JNC, Rebelo LPN, Magee JW, et al. The distillation and volatility of ionic liquids. *Nature*. 2006;439(7078):831–4.
 20. Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L. *Anal Chem*. 2013;85(13):6272–8.
 21. Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC. Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng*. 2014;2(5):1063–71.
 22. SOUZA, J.C.B.; COSTA, M. de R.; DE RENSIS, C. M. V. B.; SIVIERI K. Sorvete: composição, processamento e viabilidade da adição de probióticos. *Alim Nutr* v21, n1. 2010;155–65.
 23. Mezquita PC, Huerta BEB, Ramírez JCP, Hinojosa CPO. Milks pigmentation with astaxanthin and determination of colour stability during short period cold storage. *J Food Sci Technol*. 2015;52(3):1634–41.
 24. Prameela K, Venkatesh K, Immandi SB, Kasturi APK, Rama Krishna C, Murali Mohan C. Next generation nutraceutical from shrimp waste: The convergence of applications with extraction methods. *Food Chem [Internet]*. 2017;237:121–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.097>
 25. Pu J, Bechtel PJ, Sathivel S. Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. *Biosyst Eng [Internet]*. 2010;107(4):364–71. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2010.10.001>
 26. Corrêa N, Macedo CS, Moraes JFC, Machado NT, França LF. Characteristics of the extract of *Litopenaeus vannamei* shrimp obtained from the

- cephalothorax using pressurized CO₂. *J Supercrit Fluids*. 2012;66:176–80.
27. Schober J. Pesquisa impulsiona produção de camarões em viveiros e mercado de trabalho regional. *Notícias do Brasil*. 2002;160.
 28. Figueiredo M.C.B.; Araújo F.L.P., Rosa M.F., Moraes L.F.S., Paulino W.D. GRB. Impactos ambientais da carcinicultura de águas interiores. *Eng sanit Ambient*. 2006;11:231–40.
 29. Seabra LMJ, Pedrosa LFC. Astaxanthin: structural and functional aspects. *Rev Nutr - Brazilian J Nutr*. 2010;23(6):1041–50.
 30. Ferreira MM, Zamith HPS, Abrantes S. Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2014;73(1):1–8.
 31. Fernandes TM. Aproveitamento dos subprodutos da indústria de beneficiamento do camarão na produção de farinha. 2009;83. Available from: http://bddd.biblioteca.ufpb.br/tde_arquivos/15/TDE-2009-10-15T163858Z-141/Publico/arquivototal.pdf
 32. Ogawa MM, Maia EL, Fernandes AC, Nunes ML, Oliveira MEB, Freitas ST. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenóides. *Ciência e Tecnol Aliment*. 2007;27(2):333–7.
 33. Rodriguez-Amaya DB. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. Life Sciences. 2001. 64 p.
 34. Ambrósio C, Campos F, Faro Z. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Rev Nutr*. 2006;19(2):233–43.
 35. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. 2000;18:160–7.
 36. Martínez-Delgado AA, Khandual S, Villanueva-Rodríguez SJ. Chemical stability of astaxanthin integrated into a food matrix: Effects of food processing and methods for preservation. *Food Chem* [Internet]. 2017;225:23–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.092>
 37. Liu X, Osawa T. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a

- higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(1):187–93.
38. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod.* 2006;69(3):443–9.
 39. Lin SF, Chen YC, Chen RN, Chen LC, Ho HO, Tsung YH, et al. Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads. *PLoS One.* 2016;11(4):1–10.
 40. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem.* 2000;48(4):1150–4.
 41. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem.* 1991;63(1):141–6.
 42. Park JS, Chyun JH, Kim YK, Line LL, Chew BP. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr Metab.* 2010;7:1–10.
 43. Bennedsen M, Wang X, Willén R, Wadström T, Andersen LP. Treatment of *H. pylori* infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunol Lett.* 2000;70(3):185–9.
 44. Chan K, Pen P, Yin M. Anticoagulatory and Antiinflammatory Effects of Astaxanthin in Diabetic Rats. *J Food Sci.* 2012;77(2):76–80.
 45. Rao AR, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass - A repeated dose study. *Food Res Int [Internet].* 2013;54(1):711–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.067>
 46. Monroy-Ruiz J, Sevilla MÁ, Carrón R, Montero MJ. Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res.* 2011;63(1):44–50.
 47. Kang CD, Sim SJ. Direct extraction of astaxanthin from *Haematococcus* culture

- using vegetable oils. *Biotechnol Lett.* 2008;30(3):441–4.
48. Shyamala BN, Gupta S, Lakshmi AJ, Prakash J. Leafy vegetable extracts - Antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2005;6(2):239–45.
 49. Higuera-Ciapara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46(2):185–96.
 50. Janiszewska-Turak E. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. *Food Res Int [Internet].* 2017;99:891–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.02.001>
 51. Rao AR, Sarada R, Ravishankar GA. Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *J Sci Food Agric.* 2007;
 52. Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(1):150–65.
 53. Andreo D, Jorge N. Antioxidantes Naturais: Técnicas De Extração. *Bol do Cent Pesqui Process Aliment.* 2006;24(2):319–36.
 54. Food and Drug Regulations. Departamento of Justice. Canada (Tor). 2005;870.
 55. Zhang H, Tang B, Row KH. A Green Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasound-Assisted Method to Extract Astaxanthin from Shrimp Byproducts. *Anal Lett.* 2014;47(5):742–9.
 56. Saini RK, Keum YS. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem [Internet].* 2018;240(July 2017):90–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
 57. Tan Z, Li Q, Wang C, Zhou W, Yang Y, Wang H, et al. Ultrasonic assisted extraction of paclitaxel from *taxus x media* using ionic liquids as adjuvants: Optimization of the process by response surface methodology. *Molecules.* 2017;22(9).

58. Chen Y, Truong VNT, Bu X, Xie G. A Review of Effects and Applications of Ultrasound in Mineral Flotation. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2019;104739. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104739>
59. Fu X, Belwal T, Cravotto G, Luo Z. Sono-physical and sono-chemical effects of ultrasound: primary applications in extraction and freezing operations and influence on food components. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2019;104726. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104726>
60. Comandante R, Silva R. Estratégias de combate às microdeficiências no grupo materno-infantil. :190–8.
61. Chemat F, Vian MA, Cravotto G. Green extraction of natural products: Concept and principles. *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):8615–27.
62. Gu Y, Jérôme F. Bio-based solvents: An emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chem Soc Rev*. 2013;42(24):9550–70.
63. Farrán A, Cai C, Sandoval M, Xu Y, Liu J, Hernáiz MJ, et al. Green Solvents in Carbohydrate Chemistry: From Raw Materials to Fine Chemicals. *Chem Rev*. 2015;115(14):6811–53.
64. Häckl K, Kunz W. Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus Chim*. 2018;21(6):572–80.
65. Pena-Pereira F, Namieśnik J. Ionic liquids and deep eutectic mixtures: Sustainable solvents for extraction processes. *ChemSusChem*. 2014;7(7):1784–800.
66. Li Y, Fabiano-Tixier AS, Tomao V, Cravotto G, Chemat F. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrason Sonochem* [Internet]. 2013;20(1):12–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.005>
67. Alomar MK, Hayyan M, Alsaadi MA, Akib S, Hayyan A, Hashim MA. Glycerol-based deep eutectic solvents: Physical properties. *J Mol Liq* [Internet].

- 2016;215:98–103. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.032>
68. Han D, Row KH. Recent applications of ionic liquids in separation technology. *Molecules*. 2010;15(4):2405–26.
 69. Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK. Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc*. 2004;126(29):9142–7.
 70. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun*. 2003;9(1):70–1.
 71. Florindo C, Oliveira FS, Rebelo LPN, Fernandes AM, Marrucho IM. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustain Chem Eng*. 2014;2(10):2416–25.
 72. Hsieh YH, Li Y, Pan Z, Chen Z, Lu J, Yuan J, et al. Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. Vol. 63, *Ultrasonics Sonochemistry*. 2020.
 73. Du FY, Xiao XH, Li GK. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. *J Chromatogr A*. 2007;1140(1–2):56–62.
 74. Swatloski RP, Spear SK, Holbrey JD, Rogers RD. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J Am Chem Soc*. 2002;124(18):4974–5.
 75. Zhang Q, Vigier K, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev*. 2012;41(21):7108–46.
 76. Hamel A, Sacco M, Mnasri N, Lamaty F, Martinez J, De Angelis F, et al. Micelles into glycerol solvent: Overcoming side reactions of glycerol. *ACS Sustain Chem Eng*. 2014;2(6):1353–8.
 77. Parhi PK. Supported liquid membrane principle and its practices: A short review. *Journal of Chemistry*. 2013.
 78. Anastas PT, Williamson TC. *Green Chemistry: An Overview*. ACS Symp Ser.

- 1996;626.
79. Anastas PT, Kirchhoff MM. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc Chem Res.* 2002;35(9):686–94.
 80. Damasceno KSF. Farinha Dos Resíduos Do Camarão *Litopenaeus Vannamei* : Caracterização E Utilização Na formulação de hambúrguer. Universidade Federal de Pernambuco- UFPE; 2007.
 81. Hu J, Lu W, Lv M, Wang Y, Ding R, Wang L. Extraction and purification of astaxanthin from shrimp shells and the effects of different treatments on its content. *Brazilian J Pharmacogn [Internet].* 2019;29(1):24–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.004>
 82. Davies B. Carotenoids. Goodwin, TW (Ed) *2 Chem Biochem plant Pigment* London Acad 1976 p38-65.
 83. An G-H, Schuman DB, Johnson EA. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(1):116–24.
 84. Hartman L, Lago L. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pr.* 1973;22:475–6.
 85. Alcântara M, Lima A, Braga A, Tonon R, Galdeano M, Mattos M, et al. Influence of the emulsion homogenization method on the stability of chia oil microencapsulated by spray drying. *Powder Technol [Internet].* 2019;354:877–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.06.026>
 86. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang Mi, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(1999):6.
 87. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: Atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Cienc Rural.* 2006;36(4):1283–7.
 88. Brand-Williams, W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. 1995;30:25–30.

89. NCCL. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. In: NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2003.
90. Mann CM, Markham JL. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol.* 1998;84(4):538–44.
91. Palomino J-C, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob agents and Chemother.* 2002;46(8):2720–2.
92. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy.* 2008;54(4):328–30.
93. Razi Parjikolaei B, Errico M, Bahij El-Houri R, Mantell C, Fretté XC, Christensen KV. Process design and economic evaluation of green extraction methods for recovery of astaxanthin from shrimp waste. *Chem Eng Res Des.* 2017;
94. Bi W, Tian M, Zhou J, Row KH. Task-specific ionic liquid-assisted extraction and separation of astaxanthin from shrimp waste. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci [Internet].* 2010;878(24):2243–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.06.034>
95. Handayani AD, Sutrisno, Indraswati N, Ismadji S. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresour Technol.* 2008;99(10):4414–9.
96. Molino A, Mehariya S, Iovine A, Larocca V, Di Sanzo G, Martino M, et al. Extraction of Astaxanthin and Lutein from Microalga *Haematococcus pluvialis* in the Red Phase Using CO₂ Supercritical Fluid Extraction Technology with Ethanol as Co-Solvent. *Mar Drugs.* 2018;16(11).
97. Troter DZ, Todorović ZB, Đokić-Stojanović DR, Đorđević BS, Todorović VM,

- Konstantinović SS, et al. The physicochemical and thermodynamic properties of the choline chloride-based deep eutectic solvents. *J Serbian Chem Soc.* 2017;82(9):1039–52.
98. Sanches-Silva A, Ribeiro T, Albuquerque TG, Paseiro P, Sendón R, de Quirós AB, et al. Ultra-high pressure LC for astaxanthin determination in shrimp by-products and active food packaging. *Biomed Chromatogr.* 2013;27(6):757–64.
99. Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control* [Internet]. 2013;31(2):593–606. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039>
100. Cui Q, Peng X, Yao XH, Wei ZF, Luo M, Wang W, et al. Deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of genistin, genistein and apigenin from pigeon pea roots. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2015;150:63–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.06.026>
101. Bubalo MC, Ćurko N, Tomašević M, Kovačević Ganić K, Radojčić Redovniković I. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chem.* 2016;200:159–66.
102. Peng X, Duan MH, Yao XH, Zhang YH, Zhao CJ, Zu YG, et al. Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2016;157:249–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.065>
103. Villalobos-Castillejos F, Cerezal-Mezquita P, Hernández-De Jesús ML, Barragán-Huerta BE. Production and stability of water-dispersible astaxanthin oleoresin from *Phaffia rhodozyma*. *Int J Food Sci Technol.* 2013;48(6):1243–51.
104. Radzali SA, Baharin BS, Othman R, Markom M, Rahman RA. Co-solvent Selection for Supercritical Fluid Extraction of Astaxanthin and Other Carotenoids from *Penaeus monodon* Waste. *J Oleo Sci.* 2014;63(8):769–77.
105. Irna C, Jaswir I, Othman R, Jimat DN. Comparison Between High-Pressure Processing and Chemical Extraction: Astaxanthin Yield From Six Species of

- Shrimp Carapace. *J Diet Suppl* [Internet]. 2018;15(6):805–13. Available from: <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1387885>
106. Yang L, Sun X, Yang F, Zhao C, Zhang L, Zu Y. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of proanthocyanidins from *larix gmelini* bark. *Int J Mol Sci*. 2012;
 107. Subramanian B, Thibault MH, Djaoued Y, Pelletier C, Touaibia M, Tchoukanova N. Chromatographic, NMR and vibrational spectroscopic investigations of astaxanthin esters: Application to “astaxanthin-rich shrimp oil” obtained from processing of Nordic shrimps. *Analyst*. 2015;140(21):7423–33.
 108. Du C, Zhao B, Chen XB, Birbilis N, Yang H. Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(April):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep29225>
 109. Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, Saari N, Jahurul HA, Abbas KA, et al. PUFAs in fish: Extraction, fractionation, importance in health. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2009;8(2):59–74.
 110. Gómez-Estaca J, Calvo MM, Álvarez-Acero I, Montero P, Gómez-Guillén MC. Characterization and storage stability of astaxanthin esters, fatty acid profile and α -tocopherol of lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) waste with potential applications as food ingredient. *Food Chem*. 2017;216:37–44.
 111. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*. 2005;53(10):4290–302.
 112. Liu X, Luo Q, Rakariyatham K, Cao Y, Goulette T, Liu X, et al. Antioxidation and anti-ageing activities of different stereoisomeric astaxanthin in vitro and in vivo. *J Funct Foods* [Internet]. 2016;25:50–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.05.009>
 113. Sila A, Kamoun Z, Ghilissi Z, Makni M, Nasri M, Sahnoun Z, et al. Ability of natural astaxanthin from shrimp by-products to attenuate liver oxidative stress in diabetic rats. *Pharmacol Reports*. 2015;67(2):310–6.

114. Nogueira JM da R, Miguel L de FS. Bacteriologia. In: Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. 2009. p. 221–397.
115. Ushakumari UN, Ramanujan R. Isolation of astaxanthin from marine yeast and study of its pharmacological activity. *Int Curr Pharm J*. 2013;2(3):67–9.
116. Weintraub S, Shpigel T, Harris LG, Schuster R, Lewis EC, Lewitus DY. Astaxanthin-based polymers as new antimicrobial compounds. *Polym Chem*. 2017;8(29):4182–9.
117. Coronel LG. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e algas frente a bactérias patogênicas para aquicultura. [Florianópolis]: Universidade Federal de Santa Catarina; 2016.
118. Takeungwongtrakul S, Benjakul S, Santoso J, Trilaksani W, Nurilmala M. Extraction and stability of carotenoid-containing lipids from hepatopancreas of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J Food Process Preserv*. 2015;39(1):10–8.
119. Rao AR, Baskaran V, Sarada R, Ravishankar GA. In vivo bioavailability and antioxidant activity of carotenoids from microalgal biomass - A repeated dose study. *Food Res Int* [Internet]. 2013;54(1):711–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.067>
120. Zhang J, Peng CA. Enhanced proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells by astaxanthin-encapsulated polymeric micelles. *PLoS One*. 2019;14(5):1–20.
121. Chintong S, Phatvej W, Rerk-Am U, Waiprib Y, Klaypradit W. In vitro antioxidant, antityrosinase, and cytotoxic activities of astaxanthin from shrimp waste. *Antioxidants*. 2019;8(5):1–11.
122. Zhao X, Zhang X, Fu L, Zhu H, Zhang B. Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2016;99(13):197–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.05.007>