



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA – ITEC  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**ALINE KAZUMI NAKATA DA SILVA**

**USO COMBINADO DE TÉCNICAS NÃO CONVENCIONAIS NA  
RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA DO COPRODUTO GERADO NO  
PROCESSAMENTO DE CAMARÃO-ROSA (*Farfantepenaeus subtilis*)**

**BELÉM**

**2021**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA – ITEC  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

ALINE KAZUMI NAKATA DA SILVA

USO COMBINADO DE TÉCNICAS NÃO CONVENCIONAIS NA  
RECUPERAÇÃO DE ASTAXANTINA DO COPRODUTO GERADO NO  
PROCESSAMENTO DE CAMARÃO-ROSA (*Farfantepenaeus subtilis*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues

BELÉM

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA – ITEC  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues**  
(PPGCTA/ ITEC/ UFPA – Orientador)

---

**Prof. Dr. Nelson Rosa Ferreira**  
(PPGCTA/ ITEC/ UFPA – Membro titular interno)

---

**Prof. Dr. Gustavo Araujo Pereira**  
(FEA/ ITEC/ UFPA – Membro titular interno)

---

**Prof. Dr. Álvaro Silva Lima**  
(PPG/ UNIT – Membro titular externo)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Carolina Vieira Bezerra**  
(FANUT/ ICS/ UFPA – Membro titular externo)

---

**Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior**  
(PPGCTA/ ITEC/ UFPA – Membro suplente interno)

---

**Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Maria Leal Costa**  
(PPGEQ/ ITEC/ UFPA – Membro suplente externo)

*Dedico este trabalho, com muito amor e gratidão, à minha mãe Sumie Nakata, que não mediu esforços para lutar pela minha educação.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, agradeço por trilhar meu caminho e entregar meu destino nas mãos de minha mãe, que é a pessoa mais íntegra e amável que eu conheço. Gostaria de realçar também a insubstituível importância da minha família nessa trajetória, em especial, meus irmãos Yuji e Iuchiro, meu pai Pedro e as minhas avós Tsurue e Maria (*in memoriam*). Agradeço hoje e sempre por todo amor que me dedicaram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues pelos ensinamentos, orientação e conhecimentos repassados para a realização deste trabalho, além do grande apoio dado diante às dificuldades.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Luiza Helena Meller da Silva pelos valiosos auxílios repassados e pelo apoio durante os experimentos e realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade Federal do Pará pelo suporte fornecido para a realização deste trabalho.

Ao coordenador do PPGCTA da Universidade Federal do Pará (UFPA), Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena pelo apoio e compreensão durante todos os anos de sua gestão e à secretária Hadriane, sempre prestativa e receptiva.

À empresa AMASA S/A pelo fornecimento do coproduto do camarão-rosa, que foi o principal objeto de estudo do presente trabalho.

Ao grupo Agropalma, através do Eng<sup>o</sup> Homero Sousa, pelo fornecimento da matéria-prima oléica utilizada na extração do carotenoide de interesse.

À empresa Novozymes Latin America Ltda. pelo fornecimento das enzimas e pela disposição em ajudar sempre.

Aos Laboratórios de Análise de Alimentos, de Produtos de Origem Animal e Processamento de Alimentos, pela infraestrutura e apoio técnico, que permitiu que os experimentos fossem executados com sucesso na UFPA.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da UFPA pelo auxílio na análise de termogravimetria, em especial, agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa pela contribuição.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição indispensável à conclusão deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Análise de Alimentos por todas as conversas, momentos de descontração e da ajuda na rotina de laboratório.

Aos companheiros do “G4” do camarão (Marcus, Robson e Hayana), agradeço por fazermos parte deste grupo que se dedicou para que o projeto “camarão” acontecesse e gerasse resultados relevantes.

Em especial, agradeço ao meu parceiro, Nilcelio, pelo amor e pela paciência, mas primeiramente, por ter salvado a minha vida e ter me ajudado a me aceitar como eu sou.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho ou que estiveram comigo durante o período em que estive envolvida neste curso de pós-graduação.

Muito obrigada!

## RESUMO

A grande quantidade de coprodutos gerados na cadeia produtiva do processamento de camarão tem criado uma discussão em torno do aproveitamento desses para a fabricação de ingredientes de alto valor agregado. Nesse sentido, o aproveitamento é tanto uma tentativa de minimizar a poluição causada pela disposição inadequada dos resíduos industriais na natureza, quanto uma forma de gerar receita através da extração de substâncias de interesse econômico. Para isso, conhecer a quantidade de carotenoides e de ácidos graxos poli-insaturados do camarão-rosa (*Farfantepenaeus subtilis*), que é a principal espécie de camarão marinho produzida pela pesca de captura no estado do Pará, é essencial já que este é reconhecido como fonte dessas substâncias pela literatura especializada. No presente trabalho, foram estudadas duas formas de aproveitamento do coproduto do camarão-rosa, sendo a primeira através da secagem em leito fluidizado do tipo jorro e a segunda através da extração do carotenoide astaxantina (ASX) por meio de hidrólise enzimática combinada com extração assistida por ultrassom (EAU). Para a secagem do coproduto, o leito de jorro é uma boa alternativa devido ao seu baixo custo de operação e elevada eficiência de retirada de umidade do material. O coproduto (cefalotórax do camarão-rosa) foi triturado em processador de alimentos e então desidratado nas temperaturas de 70, 80 e 90 °C e, posteriormente, conduzido à uma etapa de extração da ASX utilizando oleína de palma como solvente nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C. Na realização da extração da ASX com hidrólise enzimática e EAU foram investigados os efeitos do tipo de enzima (alcalase, flavourzyme e uma mistura de alcalase e flavourzyme na proporção de 1:1, v/v), concentração de enzima (0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 % em relação à massa da amostra) e tempo de hidrólise (0, 60, 90 e 120 minutos). A alcalase foi a enzima mais eficiente, cuja ação culminou na extração de quase 70 % do conteúdo relativo de ASX. O teor de ASX foi afetado pela concentração de enzima de forma significativa e positiva ( $p < 0,05$ ), para todas as enzimas, porém o tempo de hidrólise foi significativo apenas parcialmente.

**Palavras-chave:** carotenoides, leito de jorro, ácido graxo, oleína de palma, enzima, extração assistida por ultrassom.

## ABSTRACT

The large amount of co-products generated in the production chain of shrimp processing has created a discussion about their use for the manufacture of high-added value ingredients. Regarding this subject, the use is both an attempt to minimize the pollution caused by the inadequate disposal of industrial waste in nature, and a way to generate income through the extraction of substances of economic interest. For this, knowing the amount of carotenoids and polyunsaturated fatty acids of the pink shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*), which is the main species of marine shrimp produced by capture fisheries in the state of Pará, is essential since it is recognized as a source of these substances by the specialized literature. In the present work, two ways of using the pink shrimp co-product were studied, the first through drying in a spouted fluidized bed and the second through the extraction of the astaxanthin (ASX) carotenoid through enzymatic hydrolysis combined with ultrasound-assisted extraction (UAE). For drying the co-product, the spouted bed is a good alternative due to its low operating cost and high efficiency in removing moisture from the material. The co-product (pink shrimp cephalothorax) was ground in a food processor and then dehydrated at temperatures of 70, 80 and 90 °C, and later, conducted to an ASX extraction step using palm olein as a solvent at temperatures of 50, 60 and 70 °C. In carrying out the ASX extraction with enzymatic hydrolysis and UAE, the effects of the enzyme type (alcalase, flavourzyme and a mixture of alcalase and flavourzyme in a ratio of 1:1, v/v), enzyme concentration (0.2; 0.4; 0.6 and 0.8 % relative to the sample mass) and hydrolysis time (0, 60, 90 and 120 minutes). Alcalase was the most efficient enzyme, whose action culminated in the extraction of almost 70 % of the relative content of ASX of the sample. The ASX content was significantly and positively affected by the enzyme concentration ( $p < 0.05$ ) for all the enzymes, but the hydrolysis time was only partially significant.

**Keywords:** carotenoids, spouted bed, fatty acid, palm olein, enzyme, ultrasound-assisted extraction.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Camarão-rosa ( <i>Farfantepenaeus subtilis</i> ) .....	20
<b>Figura 2.</b> Aspectos da morfologia externa do camarão .....	21
<b>Figura 3.</b> Resíduos de camarão descartados em um aterro sanitário .....	22
<b>Figura 4.</b> Via de bioconversão dos carotenoides .....	24
<b>Figura 5.</b> Estrutura molecular da astaxantina .....	26
<b>Figura 6.</b> Esquema fluidodinâmico de funcionamento do secador leito de jorro.....	30
<b>Figura 7.</b> Cefalotórax do camarão-rosa ( <i>Farfantepenaeus subtilis</i> ).....	39
<b>Figura 8.</b> Representação do sistema experimental da secagem do coproduto .....	40
<b>Figura 9.</b> Sistema experimental de extração de ASX do coproduto em pó .....	41
<b>Figura 10.</b> Detalhes da extração no reator de vidro encamisado .....	42
<b>Figura 11.</b> Representação do sistema experimental de cocção do coproduto .....	42
<b>Figura 12.</b> Detalhe do funcionamento da extração convencional .....	45
<b>Figura 13.</b> Detalhe do funcionamento da extração com oleína de palma .....	46
<b>Figura 14.</b> Ultrassom de banho (a) e de ponteira (b).....	47
<b>Figura 15.</b> Resumo esquemático do material e métodos .....	57
<b>Figura 16.</b> Fotos do coproduto de camarão seco em leito de jorro nas diferentes temperaturas .....	60
<b>Figura 17.</b> Curvas da fluidodinâmica do leito de jorro na temperatura de 70 °C .....	61
<b>Figura 18.</b> Curvas da fluidodinâmica do leito de jorro na temperatura de 80 °C .....	62
<b>Figura 19.</b> Curvas da fluidodinâmica do leito de jorro na temperatura de 90 °C .....	62
<b>Figura 20.</b> Temperatura do fluido de saída do leito de jorro .....	63
<b>Figura 21.</b> Conteúdo de ácidos graxos presentes nos coprodutos de camarão secos em leito de jorro.....	64
<b>Figura 22.</b> Cinética de extração da ASX a 50 °C (a), 60 °C (b), e 70 °C (c) e o modelo de transferência de massa ajustado (–) para as temperaturas de secagem (□) 70 °C; (○) 80 °C e (Δ) 90 °C.....	66
<b>Figura 23.</b> Curvas de TG e DTG da oleína de palma .....	82
<b>Figura 24.</b> Curvas de TG e DTG da amostra controle .....	82
<b>Figura 25.</b> Curvas de TG e DTG do extrato oleoso obtido com a alcalase.....	83
<b>Figura 26.</b> Curvas de TG e DTG do extrato oleoso obtido com a flavourzyme.....	83
<b>Figura 27.</b> Curvas de TG e DTG do extrato oleoso obtido com a mistura alcalase e flavourzyme (1:1, v/v) .....	84

**Figura 28.** Coproduto hidrolisado e oleína antes da sonicação (a); coproduto hidrolisado e oleína após sonicação (b); oleína de palma (c); extrato oleoso após centrifugação (d) .....85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Nomes triviais e sistemáticos de alguns carotenoides .....	23
<b>Tabela 2.</b> Composição em ácidos graxos da oleína de palma.....	38
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros do tratamento enzimático (teste preliminar).....	48
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros definitivos do tratamento enzimático.....	50
<b>Tabela 5.</b> Composição do coproduto obtido após secagem em leite de jorro.....	59
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros $Y_e$ e $k_{L,a}$ nas várias temperaturas dos processos de secagem e de extração, calculados usando o modelo cinético de transferência de massa .....	68
<b>Tabela 7.</b> Composição do coproduto do camarão-rosa .....	69
<b>Tabela 8.</b> Conteúdo de ASX e eficiência de recuperação ( $\eta$ ) nos extratos obtidos com oleína de palma (teste preliminar) .....	71
<b>Tabela 9.</b> Conteúdo de ASX nos extratos oleosos obtidos por EAE e EAU .....	75
<b>Tabela 10.</b> Eficiência de recuperação ( $\eta$ ) da ASX nos extratos oleosos obtidos por EAE e EAU.....	76
<b>Tabela 11.</b> Estabilidade oxidativa da oleína e dos extratos oleosos com o biocomposto ASX.....	79
<b>Tabela 12.</b> Dados dos parâmetros de cor da oleína, amostra controle e extratos oleosos enriquecidos com ASX.....	86
<b>Tabela 13.</b> Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da oleína e dos extratos oleosos .....	88
<b>Tabela 14.</b> Composição de ácidos graxos da oleína e dos extratos oleosos.....	90

## LISTA DE SÍMBOLOS

Abs. – Absorbância, [--]

$A_S$  – Área superficial do processo de transferência de massa, [ $L^2$ ]

ASX – Astaxantina

$C_A$  – Concentração de astaxantina no óleo de palma, [ $ML^{-3}$ ]

$C_{Ae}$  – Concentração de astaxantina no equilíbrio, [ $ML^{-3}$ ]

$d_b$  – Diâmetro superior do cone, [L]

$d_c$  – Diâmetro da coluna, [L]

$d_i$  – Diâmetro de entrada do jorro, [L]

$d_p$  – Diâmetro médio da partícula, [L]

$dN_A/dt$  – Razão de transferência de massa, [ $Mt^{-1}$ ]

$D$  – Fator de diluição da amostra seca em óleo de palma refinado, [ $ML^{-3}$ ]

$E$  – Coeficiente de extinção para astaxantina em óleo de palma, [--]

$g$  – Aceleração da gravidade, [ $Lt^{-2}$ ]

$H_o$  – Altura do leito estático, [L]

$k_A$  – Constante de reação, [ $MM^{-1}t^{-1}$ ]

$k_c$  – Coeficiente de utilização de energia, [--]

$k_e = (\text{Calor de evaporação de umidade})/(\text{Calor total consumido})$ , [--];

$k_L$  – Coeficiente de transferência de massa, [ $ML^{-2}t^{-1}$ ]

$\Delta P_m$  – Queda de pressão máxima no leito, [ $ML^{-1}t^{-2}$ ]

POO-RBD – Palm oil olein – Refinada, branqueada e desodorizada

$Q_{jm}$  – Vazão de mínimo jorro, [ $L^3t^{-1}$ ]

$t$  – Tempo de reação de extração de astaxantina, [t]

$T_{bs}$  – Temperatura de bulbo seco, [T]

$T_{bu}$  – Temperatura de bulbo úmido, [T]

$T_e$  – Temperatura de entrada do ar no leito, [T]

$T_o$  – Temperatura do ponto de orvalho, [T]

$U_{g,jm}$  – Velocidade mínima de jorro, [ $Lt^{-1}$ ]

$V$  – Volume da suspensão, [ $L^{-3}$ ]

$V$  – Volume de óleo pigmentado após a extração, [ $L^{-3}$ ]

$W$  – Massa de amostra adicionada ao óleo de palma para a extração, [M]

$Y$  – Rendimento de astaxantina por massa seca de camarão, [ $MM^{-1}$ ]

$Y_e$  – Rendimento de astaxantina por massa seca de camarão no equilíbrio, [ $MM^{-1}$ ]

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE SÍMBOLOS.....	11
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA .....	20
3.1 O Camarão-rosa: produção e processamento .....	20
3.2 Carotenoides .....	22
3.2.1 Astaxantina (ASX).....	25
3.3 Pré-tratamento do coproduto do camarão-rosa.....	27
3.3.1 Secagem.....	27
3.3.2 Cocção.....	31
3.4 Técnicas verdes de extração.....	33
3.4.1 Extração assistida por ultrassom (EAU) .....	34
3.4.2 Extração assistida por enzima (EAE).....	35
3.5 Óleo vegetal como solvente .....	36
3.5.1 Oleína de palma .....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
4.1 MATERIAL .....	39
4.1.1 Coproduto do camarão-rosa .....	39
4.1.2 Reagentes .....	39
4.2 MÉTODOS .....	40
4.2.1 Sistemas experimentais.....	40
4.2.1.1 Sistema experimental para a secagem do coproduto .....	40
4.2.1.2 Sistema experimental para a extração da ASX do coproduto em pó.....	41
4.2.1.3 Sistema experimental para o processo de cocção do coproduto.....	42
4.2.2 Composição do coproduto do camarão-rosa .....	43
4.2.3 Análise granulométrica do coproduto em pó.....	43

4.2.4 Extração do carotenoide astaxantina.....	44
4.2.4.1 Extração convencional de astaxantina.....	44
4.2.4.2 Extração da astaxantina com oleína de palma .....	46
4.2.4.3 Extração da astaxantina assistida por enzima e ultrassom .....	46
4.2.5 Análises físico-químicas nos extratos oleosos.....	51
4.2.5.1 Quantificação da astaxantina e eficiência de recuperação ( $\eta$ ) .....	51
4.2.5.2 Análise colorimétrica.....	52
4.2.5.3 Determinação do perfil de ácidos graxos.....	52
4.2.5.4 Análise de estabilidade oxidativa .....	53
4.2.5.5 Análise de compostos fenólicos totais (CFT).....	54
4.2.5.6 Atividade antioxidante (AA).....	54
4.2.5.7 Análise termogravimétrica .....	54
4.2.6 Modelagem matemática.....	55
4.2.7 Análise estatística.....	57
4.2.8 Resumo esquemático do material e métodos.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 TÓPICO 01.....	58
5.1.1 Composição da pasta do coproduto do camarão-rosa .....	58
5.1.2 Composição de ácidos graxos no coproduto seco em leite de jorro .....	64
5.1.3 Influência da temperatura na cinética de extração de ASX em oleína.....	65
5.1.4 Conclusão do tópico 01 .....	68
5.2 TOPICO 02.....	69
5.2.1 Composição da pasta do coproduto do camarão-rosa .....	69
5.2.2 Extração da ASX do coproduto pelo método convencional .....	70
5.2.3 Extração assistida por enzima e ultrassom.....	71
5.2.4 Conclusão do tópico 02 .....	73
5.3 TÓPICO 03.....	74
5.3.1 Extração assistida por enzima combinada com extração assistida por ultrassom .....	74
5.3.1 Conclusão do tópico 03 .....	77
5.4 TÓPICO 04.....	79
5.4.1 Estabilidade oxidativa .....	79
5.4.2 Análise termogravimétrica .....	81
5.4.3 Análise colorimétrica.....	85

5.4.4 Compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (AA) .....	87
5.4.5 Composição de ácidos graxos .....	89
5.4.6 Conclusão do tópico 04 .....	90
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93
APÊNDICE .....	110
ANEXOS .....	112

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui inúmeros ecossistemas que contribuem positivamente para a atividade pesqueira, como 12 % da água doce do planeta e um litoral de aproximadamente 8,5 mil quilômetros, além de 5,5 milhões de hectares de água doce que resulta em uma abundância de biodiversidade tanto no mar quanto nos rios e lagos. Esses fatores permitem que o Brasil se sobressaia como um dos mais importantes países nesta atividade (MPA, 2021). Dados da *Food and Agriculture Organization* apontam que a captura mundial de camarão registrou novos máximos em 2017 e 2018 com mais de 336.000 toneladas em cada ano (FAO, 2020). Na costa norte do Brasil, a pesca industrial desembarcou 1.081 toneladas de camarão no ano de 2010, onde o *Farfantepenaeus subtilis* representou praticamente a totalidade das espécies capturadas (ARAGÃO; SILVA; CINTRA, 2015).

Entretanto, o uso dessa matriz abundante da pesca como fonte de proteína resulta também em uma grande quantidade na geração de coprodutos, pois no segmento de pescados no Brasil, em média, 50 % do volume total da matéria-prima é aproveitado para o consumo humano, ou seja, os outros 50 % são descartados, muitas vezes, sem nenhuma finalidade. Frequentemente, esses coprodutos são dispostos de forma incorreta acarretando sérios problemas de sanidade das instalações industriais e contribuem para a contaminação ambiental, pois trata-se de um material facilmente deteriorável (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2012).

É importante mencionar que o termo coproduto, comumente classificado como resíduo na indústria alimentícia, refere-se a todos os subprodutos e sobras do processamento dos alimentos que ainda apresentam valor nutritivo e são relativamente de baixo valor econômico (JAYATHILAKAN et al., 2012). É também importante destacar que no aspecto regional, durante o processamento do camarão-rosa, na etapa de descabeçamento, descasque e remoção da extremidade da cauda, é descartada uma grande quantidade de matéria sólida, e esse volume sólido corresponde à aproximadamente 40 % do peso do crustáceo (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2012; SILVA et al., 2021).

Sob o ponto de vista nutricional, o pescado é reconhecidamente uma excelente fonte proteica, e ainda que considerada a variação entre as espécies, o



teor é sempre alto, da ordem de 15 a 25 %, sendo que a proteína encontrada nos pescados apresenta maior digestibilidade em relação à proteína de mamíferos e aves (GUZMÁN, 1994; HUA et al., 2019). Entre os pescados, o camarão surge não só como uma potencial fonte proteica, mas também como fonte de cálcio, vitaminas, pigmentos (carotenoides) e uma infinidade de compostos voláteis (HEU; KIM; SHAHIDI, 2003; TRUNG; PHUONG, 2012). Entretanto, fatores como o desenvolvimento tecnológico, a tendência crescente da globalização da economia e, principalmente a exigência do consumidor, que incorporou novos valores às suas preferências alimentares, fizeram com que as indústrias de alimentos no Brasil adotassem a atitude de inovar e aprimorar o processo de desenvolvimento de novos produtos a partir de coprodutos (NIRMAL et al., 2020).

Uma possível alternativa de agregação de valor para este material é a sua utilização para extrair pigmentos carotenoides, já que existe potencial tecnológico e demanda pelas indústrias de alimentos, farmacêutica, de cosméticos e de ração animal. Esses pigmentos estão presentes em crustáceos como camarão, lagosta e caranguejo, sendo a astaxantina (ASX) o carotenoide encontrado em maior abundância (OGAWA et al., 2007; PATTANAIK et al., 2019). A ASX é o biocomposto que confere a coloração rosa-avermelhada de alguns peixes, crustáceos, aves, plantas e microrganismos, apresentando atividade de eliminar radicais livres e proteção contra a peroxidação de lipídios e danos causados pela oxidação das membranas celulares e tecidos. Ela não é sintetizada por animais e a sua obtenção se dá através da alimentação, por isso, é crescente o seu uso como alimento funcional e suplemento farmacêutico (MEZZOMO et al., 2011). Uma das características mais relevantes da ASX é a sua atividade antioxidante, que tem sido referida na literatura como maior do que da vitamina E,  $\beta$ -caroteno e zeaxantina (MORTENSEN et al., 1997).

No entanto, a extração de biocompostos é uma das etapas mais críticas nas pesquisas com produtos naturais, pois a sua eficiência depende de vários parâmetros, como o tipo de composto a ser extraído, tipo de solvente extrator, método de extração, entre outros. Uma característica marcante nos tradicionais processos de extração é o uso de solventes orgânicos derivados do petróleo. É interessante mencionar as preocupações ambientais e de saúde nos segmentos alimentícios pelo uso desse tipo de solventes nas etapas de extração e purificação de biocompostos. Órgãos como a *American Oil Chemists' Society* e a *International*

*Union of Pure and Applied Chemistry*, vêm se atentando com a substituição do n-hexano, acetonitril, entre outros solventes, nas etapas de isolamento de compostos bioativos. Estudos feitos por esses órgãos, apontam que durante a etapa de recuperação do solvente, podem ocorrer problemas de transformação oxidativa dos extratos danificando a qualidade final do produto (YARA-VARÓN et al., 2016; CHEMAT et al., 2019). A *United States Department of Agriculture*, para efetuar a certificação de alimentos orgânicos estabelece que os ingredientes empregados na composição do produto não poderão ter sido submetidos, direta ou indiretamente, a etapas envolvendo solventes derivados do petróleo (USDA, 2021). Para superar essas e outras limitações dos métodos convencionais de extração na obtenção de extratos de produtos naturais, novas e promissoras técnicas de extração vêm sendo estudadas, tais como, extração assistida com enzima e extração assistida por ultrassom.

Essas técnicas, quando associadas ao uso de solventes de fontes renováveis, são consideradas como técnicas de Extração Verde (EV), que se enquadram nas normas postas pela *Environmental Protection Agency*, órgão dos Estados Unidos que atua no reconhecimento de processos ambientalmente corretos. Neste contexto, a literatura científica referente aos processos de EV de biocompostos vem fazendo uma ampla referência ao emprego de alguns solventes alternativos tais como óleos vegetais e CO<sub>2</sub> que são solventes derivados de fontes renováveis. Cabe também destacar que entre os processos de EV, a técnica de hidrólise enzimática com enzimas proteolíticas vem sendo largamente utilizada (CAHÚ et al., 2012; SILA et al., 2014; KETNAWA et al., 2016). Essa técnica tem como princípio promover a ruptura estrutural do coproduto e pode ser uma alternativa promissora para separar os biocompostos de interesse sem comprometer o valor nutritivo, mantendo as propriedades bioquímicas que ressaltam as qualidades do produto, e viabilizando a sua comercialização a custos elevados para um mercado selecionado (GBOGOURI et al., 2004).

A ASX existe principalmente em associação com outros compostos devido às suas características específicas de ligação, formando um complexo químico com proteínas (caroteno-proteínas) ou lipoproteínas (caroteno-lipoproteínas) situados principalmente no cefalotórax do camarão (HIGUERA-CIAPARA; FELIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006) e a aplicação de um tratamento com enzimas proteolíticas permite a quebra da ligação desses complexos, facilitando a extração

da ASX através da melhoria do acesso do solvente ao pigmento (BABU; CHAKRABARTI; SAMBASIVARAO, 2008).

Outra alternativa às técnicas convencionais para a extração de ASX é a extração assistida por ultrassom, que tem sido amplamente aplicada pela sua eficiência e alta taxa de extração (ORIO et al., 2012). Associado a esse fator, este método também apresenta outras vantagens na obtenção de extratos naturais como, a simplicidade do equipamento, economia no custo inicial, redução do tempo e da temperatura de extração e redução da quantidade de reagentes (ROY et al., 2020).

Outro importante aspecto na viabilidade do aproveitamento deste tipo de coproduto está relacionado à sua conservação e seu armazenamento. Em geral, o processo de extração de biocompostos a partir de coprodutos é antecedido por um processo de remoção de umidade. Geralmente nessa etapa são empregados secadores do tipo estufa ou liofilizador, que demandam muito tempo, sendo esta última, um processo de custo elevado (PARJIKOLAEI et al., 2015). Um processo alternativo de remoção de água é a secagem em leito de jorro, que é uma técnica relativamente simples, de baixo custo e com tempos de secagem bem inferiores aos processos de secagem em estufa e liofilização. Além disso, esse sistema também já vem sendo utilizado na desidratação de materiais termo sensíveis com sucesso (ARAÚJO et al., 2015).

Levando-se em consideração a conservação, a extração e a questão ambiental envolvida, e sendo o coproduto do processamento do camarão-rosa uma fonte potencial de compostos bioativos, é necessário que se realizem estudos acerca do aproveitamento desse material para a produção de ingredientes com valor agregado e que possam ser aplicados industrialmente.

Nesse contexto, este trabalho foi dividido em duas etapas a saber: i) realizou-se o estudo sobre os efeitos da secagem em leito fluidizado do tipo jorro com a presença de partículas inertes na recuperação do carotenoide ASX oriundo do cefalotórax do camarão-rosa (coproduto) e ii) a extração do carotenoide ASX do coproduto com aplicação das técnicas de extração assistida com enzima e extração assistida por ultrassom (técnicas não-convencionais). Cabe destacar que as duas etapas foram aplicadas com o uso do conceito de extração verde para tornar os produtos mais atrativos, favorecendo a sua utilização principalmente como ingrediente alimentar.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo da secagem em leito de jorro do cefalotórax do camarão-rosa, bem como analisar os efeitos da hidrólise enzimática e do ultrassom na extração do carotenoide astaxantina a partir do coproduto gerado pela indústria de processamento de camarão-rosa.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Caracterizar o coproduto do camarão-rosa;
- ii. Aplicar a secagem em leito de jorro no coproduto do camarão-rosa e estudar a influência dos parâmetros térmicos e fluidodinâmicos do processo de secagem no teor de astaxantina do coproduto em pó;
- iii. Realizar a modelagem matemática da cinética de extração da astaxantina do coproduto em pó;
- iv. Estudar o efeito da hidrólise enzimática na recuperação da astaxantina do coproduto do camarão-rosa, utilizando extração assistida por ultrassom;
- v. Avaliar a qualidade dos produtos obtidos.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O CAMARÃO-ROSA: PRODUÇÃO E PROCESSAMENTO

O camarão-rosa é, na verdade, uma denominação genérica para três distintas espécies (*Farfantepenaeus paulensis*, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus subtilis*) da família Penaeidae (Figura 1), porém, as mesmas são muito similares em aparência. Estas espécies vivem em regiões arenosas e lodosas nas enseadas de pouca profundidade ou ao longo da costa (águas tropicais e subtropicais do Atlântico), formando grandes grupos, principalmente no seu período reprodutivo. Geralmente se alimentam de algas, plânctons ou matéria orgânica em decomposição nos fundos arenosos (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2006).



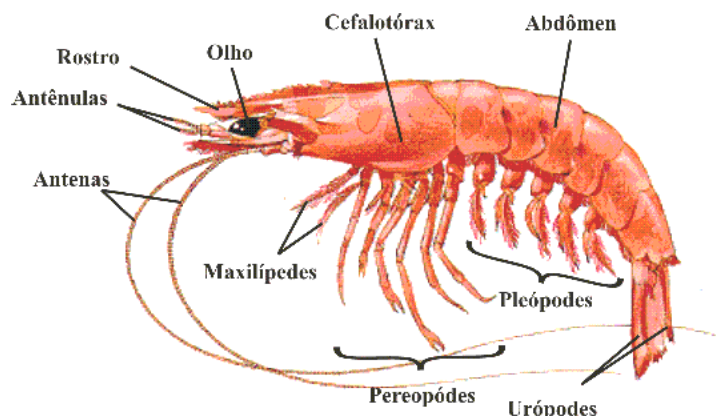
**Figura 1.** Camarão-rosa (*Farfantepenaeus subtilis*)

Fonte: FAO (2018)

A pesca extrativa de camarões marinhos no Brasil é uma das atividades de maior importância no cenário pesqueiro nacional, onde o Estado do Pará é um dos principais produtores nacionais. Grande parte desta produção é destinada ao mercado externo (Japão, EUA e Europa) na forma de caudas congeladas (DIAS-NETO, 2011; ARAGÃO; SILVA; CINTRA, 2015).

Na etapa do processamento, várias partes deste crustáceo são descartadas, tais como o cefalotórax e as pleópodes (Figura 2), gerando assim uma grande quantidade de resíduo sólido. Os camarões apresentam o corpo dividido em duas partes: cefalotórax e abdômen. O cefalotórax é constituído por vários

segmentos que formam uma peça única, e o abdômen é constituído por seis segmentos seguidos de uma estrutura pontiaguda (AMIGUET et al., 2012).



**Figura 2.** Aspectos da morfologia externa do camarão

Fonte: Soares (2013)

O corpo deste animal é alongado e achatado lateralmente e revestido por um exoesqueleto formado basicamente por quitina e sais de cálcio. A extremidade anterior do cefalotórax apresenta um prolongamento em forma de espinho, o rostro, ao longo do qual se encontram estruturas dentadas em sua superfície superior e inferior. Abaixo do rostro estão localizados os pedúnculos oculares (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2006).

De acordo com o boletim informativo do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) de dados estatísticos referentes à pesca, no Brasil, a produção pesqueira apresenta um quadro onde a pesca marinha foi a principal fonte de pescado em 2010, sendo a costa norte do Brasil uma das mais produtivas do país e responsável por 29 % do total do pescado brasileiro (MPA, 2012). Associado a esse crescimento na produção, é importante levar em consideração que a quantidade de resíduos, por consequência, também se eleva, gerando assim, sérios problemas de sanidade das instalações industriais e contribuindo para a contaminação ambiental, pois trata-se de um material facilmente deteriorável (NIRMAL et al., 2020; SILVA et al., 2021).

Quando depositados em aterros, esses resíduos são responsáveis pela formação de lixiviados e gases provenientes da fermentação dos compostos orgânicos, promovendo poluição, mau cheiro e proliferação de vetores de doenças, como insetos e ratos. A Figura 3 exhibe resíduos do processamento de camarão sendo depositados em um aterro sanitário. Cabe também destacar que esse

material, quando jogado no mar ou em rios, liberam odores desagradáveis, proporcionam a proliferação exagerada de algas e tornam-se um grande passivo ambiental (HONORATO, 2006).



**Figura 3.** Resíduos de camarão descartados em um aterro sanitário

Fonte: John (2012)

O aumento da pressão pela conservação dos ecossistemas e a preocupação cada vez maior dos consumidores com a qualidade ambiental dos produtos têm conduzido as empresas processadoras de camarão à reconsultarem suas estratégias no que diz respeito ao destino dos seus resíduos. Alguns trabalhos disponíveis na literatura reportam o uso de cabeças de camarão para a obtenção de hidrolisados proteicos, quitina e quitosana (GILDBERG; STENBERG, 2001), carotenoides (SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006, BABU; CHAKRABARTIB; SAMBASIVARAO, 2008) e glicosaminoglicanos (BRITO et al., 2008). Cabe aqui destacar que o cefalotórax do camarão-rosa é uma importante fonte natural de ASX, podendo ser uma alternativa ao carotenoide sintético usado na formulação de rações para a aquicultura, além do enorme potencial de aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SACHINDRA; MAHENDRAKAR, 2005; SACHINDRA; BHASKAR; MAHENDRAKAR, 2006).

### 3.2 CAROTENOIDES

Os carotenoides constituem o grupo de pigmentos orgânicos mais difundidos na natureza e são responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha.

Esses pigmentos são muito empregados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e de ração animal. Na natureza são conhecidos aproximadamente 600 carotenoides, que são divididos em dois grandes grupos: os carotenos, que são hidrocarbonetos, e as xantofilas, que são compostos orgânicos que possuem grupos funcionais oxigenados. Desses dois grupos, cerca de 70 podem ser encontrados nos alimentos, como por exemplo, o  $\beta$ -caroteno, a luteína, a zeaxantina, o licopeno e a astaxantina (GOMES, 2007; MERHAN, 2017).

Essa classe de compostos orgânicos não pode ser sintetizada pelos mamíferos, porém podem ser absorvidos através da dieta. São capazes de sintetizar carotenoides os microrganismos não fotossintéticos como fungos e leveduras, as algas, as bactérias e as plantas (OGAWA et al., 2007; YARA-VARÓN et al., 2016; OGUZ, 2017).

Os carotenoides são incorporados na alimentação humana principalmente através de vegetais, onde se situam em raízes, folhas, talos, sementes, frutas e flores. Além disso, alguns pescados e seus derivados podem ser utilizados na obtenção destes pigmentos. Na indústria de alimentos, os carotenoides podem exercer uma dupla função: i) colorir os alimentos incolores ou uniformizar sua coloração, de maneira a torná-los mais atrativos aos olhos dos consumidores e ii) enriquecer nutricionalmente os alimentos. Na Tabela 1 estão relacionados alguns dos carotenoides usados para este fim (HAMERSKI; REZENDE; SILVA, 2013).

**Tabela 1.** Nomes triviais e sistemáticos de alguns carotenoides

Nome Trivial	Nome Sistemático
Astaxantina	3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona
Cantaxantina	$\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona
Bixina	$\psi$ -carotenodiólico
$\beta$ -caroteno	$\beta,\beta$ -caroteno
Licopeno	$\psi$ - $\psi$ -caroteno
Zeaxantina	$\beta,\beta$ -caroteno-3,3'-diol

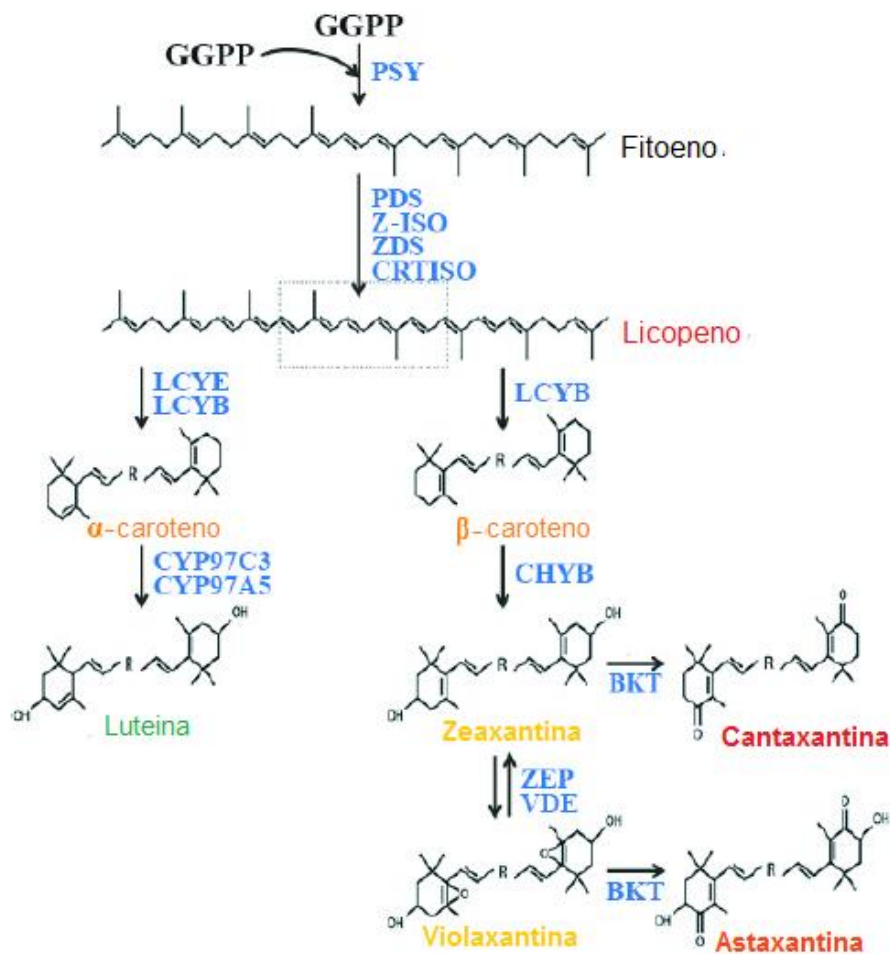
Fonte: Hamerski, Rezende e Silva (2013)

Diversos estudos também demonstram que os carotenoides possuem atividades biológicas importantes, destacando-se a prevenção de doenças



inflamatórias e neurodegenerativas onde espécies reativas possuem papel fundamental no seu desenvolvimento, como por exemplo, arteriosclerose, catarata, esclerose múltipla, câncer, mal de Alzheimer, degeneração macular e doenças cardiovasculares (MALDONADE et al., 2007; AKSU; EREN, 2007).

Em crustáceos, os carotenoides estão presentes na forma de complexos proteicos (caroteno-proteínas e caroteno-lipoproteínas), principalmente na carapaça, apêndices torácicos, sangue, olhos, ovos, hepatopâncreas e ovário. Assume-se que os carotenoides em crustáceos apresentam várias funções relevantes no processo biológico como reprodução, incubação, crescimento e estabilidade de proteínas (NÉGRE-SADARGUES et al., 2000). No esquema da Figura 4 é possível visualizar as etapas da biossíntese de transformação da astaxantina a partir de um bloco de construção precursor comum a todos, que geralmente são os isoprenóides (SATHASIVAM; KI, 2018).



**Figura 4.** Via de bioconversão dos carotenoides

Fonte: Sathasivam e Ki (2018)

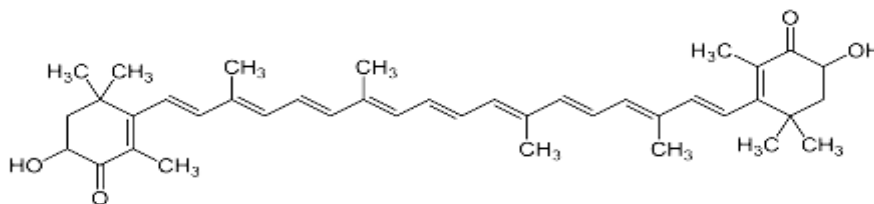
O hepatopâncreas de espécies carnívoro-necrófagas, como crustáceos, é um órgão marcadamente pigmentado. A ocorrência de carotenoides na epiderme recobrando os olhos está associada à estocagem de pigmentos de origem alimentar, indicando uma função fisiológica determinada (NÉGRE-SADARGUES et al., 2000). No exoesqueleto de várias espécies de crustáceos são encontradas também as proteínas pigmentadas denominadas crustacianinas, em que a sua coloração está interligada ao carotenoide ASX. Com o tratamento térmico, a desnaturação da proteína o libera e a sua cor avermelhada se revela, sendo que estes carotenoides livres absorvem luz em comprimento de onda entre 400-500 nm (HIGUERA-CIAPARA; FELIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006).

Cabe também destacar algumas funções conhecidas dos carotenoides como a absorção de luz, a atividade antioxidante, a atividade anticancerígena, o transporte de oxigênio e a atividade provitamínica, além de possuir caráter lipofílico, portanto são insolúveis em água (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; MERHAN, 2017).

### **3.2.1 Astaxantina (ASX)**

A ASX (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4'-diona) é um oxicarotenoide de cor vermelho-alaranjado de fórmula  $C_{40}H_{52}O_4$  e peso molecular 596,86g/ mol. É o carotenoide mais abundante no ecossistema marinho e presente em alguns peixes como salmão e truta, bem como na maioria dos crustáceos como em camarões, caranguejos e lagostas. Na forma cristalina e pura, esta aparece como um pó fino de coloração escura violeta amarronzada. Seu ponto de fusão é aproximadamente 224 °C. É insolúvel em solução aquosa mas pode ser dissolvida a temperatura ambiente em diclorometano, clorofórmio, acetona, dimetilsulfóxido e outros solventes não polares (JOHNSON; AN, 1991; OGUZ, 2017).

Dependendo da sua origem, a ASX (Figura 5) pode ser encontrada na forma livre ou conjugada com outros compostos como proteínas ou esterificada com um ou dois ácidos graxos, os quais estabilizam a molécula. A ASX na forma livre é considerada como instável e extremamente sensível a fatores como luz, oxigênio, acidez e calor (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003; HUSSEIN et al., 2006).



**Figura 5.** Estrutura molecular da astaxantina

Fonte: Köpsel et al. (2005)

A aplicação da ASX é de grande importância também nos segmentos de avicultura e aquicultura, onde é principalmente utilizada como aditivo em ração, em função de sua ação como corante (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). Na avicultura, a ASX pode ser utilizada na pigmentação da carne de aves e da gema de ovos. Na aquicultura, a produção em cativeiro de peixes (salmão, truta) e crustáceos (lagosta, camarão), para os quais a coloração da carne e/ou carapaça é um fator determinante na aceitação pelo consumidor e no preço final do produto, a ASX é adicionada na alimentação. Outras funções da ASX no organismo desses animais incluem: ação antioxidante, precursor hormonal, melhora da imunidade, reprodução, crescimento, maturação e foto-proteção (LORENZ; CYSEWSKI, 2000; OROSA et al., 2005).

Cabe destacar que grande parte da ASX suplementada na dieta do pescado oriundo da aquicultura era fornecida pela rota sintética, segundo Higuera-ciapara, Felix-Vanenzuela e Goycoolea (2006). Entretanto, o crescimento na demanda de alimentos mais naturais e os altos custos dos pigmentos sintéticos têm estimulado a pesquisa de fontes naturais de ASX com potencial industrial. Associado a isso, é importante destacar que a síntese química da ASX é complexa e de elevado custo devido à presença de centros quirais na sua estrutura molecular (CHOCIAI et al., 2002; JEON; CHO; YUN, 2006; SÁNCHEZ-CAMARGO, 2011).

Sob o aspecto nutricional, estudos clínicos reportam que a ASX possui elevada atividade antioxidante, ou seja, possui a capacidade de remover radicais livres de um sistema e destruir o oxigênio singlete, diminuindo assim os sérios danos celulares causados por essas espécies (RIBEIRO et al., 2005; SOWMYA; SACHINDRA, 2011). Estudos têm demonstrado que a ASX possui atividade antioxidante muito maior do que outros carotenoides como a zeaxantina, a luteína, a cantaxantina, o  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -tocoferol (NIELSEN et al., 1996; NAGUIB, 2000;

CHOCIAI et al., 2002; FRANCO-ZAVALETA et al., 2010; MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017).

É importante mencionar que a ASX também tem demonstrado efeitos benéficos na redução do risco de diversas doenças como câncer, hipertensão, disfunção cardiovascular, catarata, colesterol, dispepsia, obesidade, inflamações crônicas, Alzheimer e Parkinson (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003; HUSSEIN et al., 2006; HIGUERA-CIAPARA; FELIX-VANENZUELA; GOYCOOLEA, 2006; MEZZOMO et al., 2015).

### 3.3 PRÉ-TRATAMENTO DO COPRODUTO DO CAMARÃO-ROSA

Com intuito de facilitar o processo de recuperação da ASX e conseqüentemente obter maiores rendimentos de extração, alguns pré-tratamentos importantes vêm sendo efetuados, devido principalmente à composição e outras peculiaridades desse tipo de coproduto, como a elevada umidade e forte associação entre a ASX e outras macromoléculas presentes no cefalotórax do camarão. Alguns desses pré-tratamentos são: redução de tamanho, cocção, secagem, e classificação granulométrica.

#### 3.3.1 Secagem

Secagem é uma operação unitária que envolve transferência simultânea de calor e massa, que pode ainda abranger a transferência de quantidade de movimento. Nesta operação ocorre a remoção de água de uma matriz (MUJUNDAR, 1987; DINÇER; ZAMFIRESCU, 2016; ARAL; BEŞE, 2016).

Dependendo da espécie de camarão, a umidade do coproduto representa cerca de 75 % de sua composição centesimal (GILDBERG; STENBERG, 2001) e a secagem dessa matriz é importante para determinados processos de extração pois proporciona maior superfície de contato entre o soluto e o solvente, favorecendo os processos de difusão e intensificando a transferência de massa (KAKUDA; KASSAM, 2006; SAHENA et al., 2009). Mezzomo et al. (2011) e Seabra et al. (2014) realizaram a extração de ASX de coproduto de camarão *in natura* e desidratados e

verificaram que o rendimento de extração de ASX nos coprodutos secos foi bem maior do que nas amostras sem o prévio tratamento de secagem.

Cabe ressaltar que na maioria dos estudos sobre a extração de carotenoides a partir de camarão, a preparação do coproduto desse crustáceo, visando a remoção de água, geralmente são efetuadas empregando-se a liofilização (HANDAYANI; INDRASWATI; ISMADJI, 2008; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2011 2012; PARJIKOLAEI et al., 2015; TSIKA et al., 2015) e a secagem convectiva em estufa (MEZZOMO et al., 2011, 2013; CORREA et al., 2012; SEABRA et al., 2014).

Porém, é importante mencionar que o custo da operação é um fator crítico na viabilização do produto final e para escolher o secador mais apropriado deve-se responder algumas perguntas no que se refere aos aspectos de custo do equipamento e do processo, facilidade de uso do equipamento, tempo do processo, tamanho da unidade de processamento, facilidade de manuseio do produto e a qualidade do mesmo (KIRANOUDIS; MAROULIS; MARINOS-KOURIS, 1996; HONORATO, 2006).

A liofilização é um processo de secagem muito utilizado na área de alimentos e de fármacos que consiste na sublimação da água presente no alimento a baixas temperaturas e sob vácuo. Por isso, o material a ser seco deve ser previamente congelado (ORREGO-ALZATE, 2008). O processo de liofilização é caracterizado por três estágios: estágio de congelamento (o alimento torna-se completamente sólido a temperaturas inferiores ao seu ponto de início de congelamento); estágio de secagem primária (a água congelada é removida por sublimação) e estágio de secagem secundária (um leve aquecimento promove a dessorção da água ligada) (SNOWMAN, 1997; BEZERRA, 2014).

Uma das maiores limitações do processo de liofilização é o longo tempo de secagem, causado pelo baixo desempenho de transferência de calor no interior do material, e as baixas pressões de trabalho, que fazem com que o principal mecanismo de transferência de calor seja a radiação, já que existe pouca convecção e uma baixa condução entre as superfícies de contato sob vácuo (HAMMAMI; RENÉ, 1997). Devido a isso, uma grande quantidade de energia para a sublimação e para a remoção do vapor de água da câmara é requerida, fazendo com que o processo se torne caro. Somado a isso, o custo do equipamento também é elevado. A partir de uma visão industrial, deve-se buscar outras técnicas de secagem com

custo mais baixo, com curto tempo de processo, mas que produzam materiais de qualidade semelhante (ROSA et al., 2008).

A secagem em estufa é um dos métodos mais utilizados na área de alimentos e consiste na remoção de água através do aquecimento da matriz a ser seca. Nesse tipo de secador, o alimento é colocado em bandejas ou em outros acessórios similares, sendo exposto a uma corrente de ar quente em ambiente fechado. O ar quente transfere calor para a superfície sólida do alimento a ser seco através de convecção. Posteriormente, por condução, ocorre a troca de calor entre a superfície aquecida e o centro do material, devido ao gradiente de temperatura que existe entre estas duas regiões (OLIVEIRA; BRANDAO; SILVA, 2016).

Apesar de o equipamento ser barato e o método ser simples, a eficiência do processo depende de um bom controle da temperatura, da movimentação do ar dentro da estufa, do tamanho e espessura da amostra e da posição da amostra dentro da estufa. As principais desvantagens da secagem em estufa são o longo tempo de secagem (devido à lenta transferência de calor causada pela baixa difusividade térmica dos alimentos) que causa um alto consumo energético; não sendo recomendável para amostras com elevado conteúdo de umidade e termo sensíveis, pois pode causar a degradação de alguns compostos presentes nos alimentos (PASTORINI; BACARIN; ABREU, 2002; OLIVEIRA; BRANDAO; SILVA, 2016).

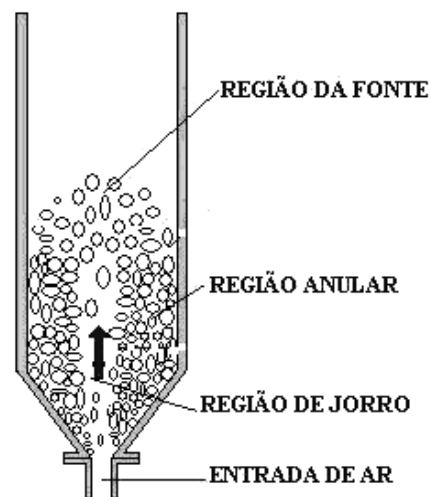
Alguns estudos apresentados na literatura sugerem as seguintes condições na secagem em estufa de coproduto de camarão para posterior extração de carotenoides a saber: Mezzomo et al. (2011) efetuaram a secagem de coproduto de camarão na temperatura de 60 °C por 5 horas para reduzir a umidade do produto a 46,30 %. Correa et al. (2012) aplicando temperatura de 60 °C e tempo de 12 horas reduziu a umidade do produto a 8,75 %. Mezzomo et al. (2013) submetendo coprodutos de camarão a temperatura de 60 °C por 10 horas conseguiram reduzir a umidade do produto a 11,21 % e Seabra et al. (2014) empregando temperatura de 70 °C ao longo de 8 horas conseguiram reduzir a umidade do produto a 8,9 %.

Outra alternativa de processo de secagem é através do equipamento leito de jorro, que vem sendo apresentado na literatura, como uma ótima técnica para a secagem de pastas e suspensões, produzindo produtos em pó com alta qualidade e com baixo custo (SOARES; PEREIRA, 2020). A primeira utilização desta técnica foi na secagem de trigo por Gishler e Mathur, em 1954, no *National Research Council*

no Canadá. Em função dos estudos que comprovam a sua eficácia na desidratação de produtos termicamente sensíveis, essa técnica vem sendo bastante utilizada na secagem de produtos farmacêuticos e alimentícios e quando comparado com outras técnicas, destaca-se por apresentar uma alta taxa de transferência de massa e calor e curto tempo de residência da amostra no leito (PABLOS et al., 2018).

O leito de jorro utiliza a fluidização com contato líquido-gás, que devido a sua grande flexibilidade de operação tornou-se útil e competitivo para a secagem de grãos, porém, seu uso ampliou-se para a secagem de produtos úmidos como as pastas e sólidos em suspensão (SOARES; PEREIRA, 2020).

O leito de jorro geralmente é formado por uma coluna cilíndrica com base cônica. A parte inferior dessa base possui uma abertura cujo diâmetro é reduzido em relação ao diâmetro da coluna cilíndrica, como mostra a Figura 6.



**Figura 6.** Esquema fluidodinâmico de funcionamento do secador leito de jorro

Fonte: Duarte (2006)

A entrada do agente secante, que normalmente é o ar, ocorre pela parte inferior da base cônica e o equipamento deve operar com partículas inertes sólidas com diâmetro ( $D_p$ ) superior a 3 mm. Na Figura 5 é possível visualizar a formação de três regiões distintas a saber: (i) região central (jorro), onde ocorre o transporte pneumático das partículas devido à grande velocidade do fluido injetado no sistema; (ii) região da fonte, segmento acima do leito, onde as partículas oriundas da região central se movimentam em regime desacelerado, como em uma fonte; (iii) região

anular, onde as partículas oriundas da fonte caem e deslizam para parte inferior do leito até alcançar a região de jorro novamente.

Cabe destacar que a secagem de pasta e suspensão pelo uso da técnica de leito de jorro envolve necessariamente a utilização de um leito de partículas inertes, o que resulta na obtenção de um produto em pó finamente disperso ou até particulados com  $D_p > 5$  mm e  $D_p < 10$   $\mu$ m (FREIRE et al., 2011; NIKSIAR; NASERNEJAD, 2017).

O processo de secagem de suspensões em leito de jorro com partículas inertes ocorre quando a pasta ou suspensão que foi injetada no leito recobre as partículas e é seca pelo ar quente. A alimentação da suspensão pode ser feita na base do leito ou acima da região anular e de jorro, através de injetores (FREIRE, 1992; FREIRE et al., 2011). As partículas inertes, em contato com a alimentação são recobertas por uma fina película de suspensão e a evaporação da água nessa película ocorre à medida que os inertes circulam no interior do leito. Ao passar do estado elastoplástico para o elastofrágil, a película de suspensão torna-se frágil e friável em razão das colisões entre as partículas, favorecendo a abrasão da partícula seca e a elutriação das partículas finas. O pó formado é arrastado pela corrente de ar e separado em ciclones ou sistemas de filtro (PASSOS et al., 1997; SOARES; PEREIRA, 2020). As partículas inertes, livres do produto, recirculam no leito, sendo novamente recobertas por suspensão.

Cabe ressaltar que o processo cíclico de deposição, secagem e quebra das partículas e a elutriação dos finos, ocorrem continuamente sempre que a temperatura do leito, para um dado fluxo de alimentação, seja mantida suficientemente elevada para que a proporção de partículas úmidas e pegajosas no leito, em condições estacionárias, seja pequena e o movimento do leito de partículas não se desestabilize pela aglomeração de partículas úmidas (FREIRE, 1992; PASSOS et al., 1997; CUI; GRACE, 2018).

### **3.3.2 Cocção**

A literatura científica destaca que determinados nutrientes existentes em determinada matriz alimentar podem ser mais facilmente disponíveis no momento da extração quando a mesma é submetida a um tratamento térmico como a cocção.



Entretanto, esses estudos alertam que o valor nutricional dos alimentos depende de muitos dos métodos de cocção e da intensidade aplicada, pois propriedades como a aparência, cor, sabor e textura podem melhorar ou piorar dependendo da adequação do tempo e da técnica utilizada (KALA; PRAKASH, 2006; KUMAR; AALBERSBERG, 2006; BONGONI et al., 2014).

No estudo da extração de carotenoides dos cromoplastos de matrizes alimentícias (cenoura e tomate), reportado por Palmero et al. (2014), os autores relatam que ao tratar as frações de agrupamento de células (pequenas e grandes) a temperaturas variando de 95 a 115 °C, foi obtida uma diminuição significativa da bioacessibilidade *in vitro* de  $\beta$ -caroteno em comparação com a amostra crua, porém, ao tratar a amostra a 125 °C foi obtido um valor semelhante de bioacessibilidade do  $\beta$ -caroteno como na amostra crua. Isso pode indicar que, a essa intensidade térmica, o  $\beta$ -caroteno se liberta do aprisionamento, confirmando que são necessárias maiores intensidades de processamento térmico para superar o possível aprisionamento por componentes da parede celular, levando a uma redução do efeito de barreira da parede celular, e que a intensidade do tratamento térmico é um fator importante a ser controlado para obter um aprimoramento da bioacessibilidade do carotenoide.

Os métodos de cocção utilizados na área de alimentos se dividem em 3 grandes princípios, são eles: i) a condução, a qual é feita com calor seco, onde a matriz alimentícia é exposta a um contato direto com uma superfície aquecida, ii) por convecção onde o alimento fica exposto a um fluxo de calor úmido (vapor) e iii) radiação, que pode ser infravermelha ou micro-ondas, onde a energia é transferida de uma fonte para o alimento por meio de ondas (MEJIDO, 2012; ARAUJO et al., 2014). Cabe destacar que neste estudo aplicamos o método de cocção por convecção com vapor sob pressão.

A preparação em calor úmido por convecção, é feita pela distribuição homogênea de temperatura no alimento pela difusão de zonas mais quentes onde a energia está em alta concentração, para as zonas mais frias, onde a energia é baixa, sendo este meio por cocção o mais utilizado para alimentos (AQUINO et al., 2011; ARAUJO et al., 2014).

A literatura científica destaca que alguns alimentos possuem substâncias antinutricionais, que reduzem o valor nutritivo dos alimentos e que podem afetar a digestibilidade, a disponibilidade, a absorção ou a utilização do nutriente. Entretanto,

se estes alimentos forem expostos a algum tipo de tratamento térmico em condições adequadas, o conteúdo e a atividade do composto antinutricional pode ser reduzido, uma vez que são sensíveis ao aquecimento (OLAYIWOLA et al. 2009; APATA; BABALOLA, 2012).

A cocção por vapor destaca-se entre os métodos de cocção por convecção por conservar o valor nutritivo e as características sensoriais dos alimentos, visto que se perdem poucos nutrientes por lixiviação, pois o alimento, geralmente, não entra em contato com o líquido. Quando se efetua a cocção por vapor sob pressão, a velocidade de aquecimento do alimento é muito maior, facilitando a distribuição homogênea de temperatura pela difusão do calor e reduzindo as perdas por dissolução (TOLEDO; CANNIATI-BRAZACA, 2008; ARAUJO et al., 2014).

### 3.4 TÉCNICAS VERDES DE EXTRAÇÃO

O desenvolvimento de procedimentos de extração que possibilitem a utilização de solventes menos agressivos ao meio ambiente e não-tóxicos à saúde, que sejam usados em menor quantidade e sejam derivados de fontes renováveis, têm sido propostos em concordância com o desenvolvimento da chamada química verde (HERRERO et al., 2010; RODRÍGUEZ-ROJO et al., 2012).

Para superar as limitações dos métodos convencionais de extração na obtenção de extratos de produtos naturais, novas e promissoras técnicas vêm sendo estudadas visando o setor produtivo. Essas técnicas são conhecidas como técnicas de extração não-convencionais, onde, o menor consumo de reagente e tempo de extração são vantagens frequentemente pontuadas em comparação aos métodos tradicionais.

Algumas das técnicas mais promissoras são: extração assistida por ultrassom, extração assistida por enzima, extração assistida por micro-ondas, extração assistida por campo elétrico pulsado, extração com fluido supercrítico e extração com líquido pressurizado. Algumas dessas técnicas são consideradas como extrações verdes, já que se enquadram nas normas estabelecidas pela *Environmental Protection Agency*, órgão oficial dos Estados Unidos para o reconhecimento de processos ambientalmente corretos. No presente estudo serão

utilizados como métodos de extração não-convencionais a extração assistida por ultrassom e a extração assistida por enzima.

### **3.4.1 Extração assistida por ultrassom (EAU)**

O ultrassom é uma onda mecânica que se diferencia do som audível pelos seres humanos por apresentar frequências maiores que 20 kHz (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE; PERALBO-MOLINA, 2011; CHEMAT et al., 2011) e propaga-se em meios sólidos, líquidos e gasosos (CASTRO; CAPOTE, 2007; SERRADILLA; CAPOTE; CASTRO, 2007). Um dos fenômenos produzidos quando o ultrassom se propaga nos líquidos é o fenômeno de cavitação (ESCLAPEZ et al., 2011).

A cavitação ocasiona a formação de cavidades, para onde os gases dissolvidos no sistema migram, formando microbolhas que aumentam e diminuem de tamanho, gerando ciclos de expansão e compressão até que as bolhas implodem, liberando grande quantidade de energia e exercendo elevadas pressões próximas à região da implosão (CASTRO; CAPOTE, 2007; VEILLET et al., 2010; CÁRCEL et al., 2010).

Na EAU, a presença de materiais sólidos no sistema provoca uma implosão assimétrica das microbolhas gerando jatos que colidem com as superfícies sólidas e também ocasiona a circulação de líquidos, devido à turbulência gerada. Essas colisões fazem com que células sejam rompidas, facilitando a difusão do solvente extrator para o interior da matriz (CASTRO; CAPOTE, 2007; SHIRSATH et al., 2012). Somando-se a isso, o calor liberado pelas implosões aumenta a solubilidade dos analitos, favorecendo o aumento da eficiência da extração (VEILLET et al., 2010). Assim, é possível agitar a mistura e extrair os compostos em um tempo muito mais curto que aqueles utilizados pelos métodos tradicionais de extração, e ainda utilizar uma quantidade pequena de solvente (VILKHU et al., 2008; CHEMAT et al., 2011).

A EAU tem sido bastante aplicada na extração de diversos compostos bioativos presentes em diferentes matrizes. Khan et al. (2010) extraíram os compostos fenólicos hesperidina e naringina de casca de laranja num período de 30 minutos empregando ultrassom. Ghafoor et al. (2011) obtiveram extratos com elevada concentração de antocianinas a partir de casca de uva usando EAU e

diferentes tipos de solventes. Araujo et al. (2013), utilizando EAU, efetuaram extração de óleo com elevada concentração de ácido docosaenoico (DHA) a partir de diferentes microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros mulleri*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella* sp., *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis* sp., *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis tetrathele* e *Thalassiosira weissflogii*). Herrera e Castro (2004) extraíram compostos fenólicos como rutina, naringina, naringenina e quercetina a partir de morangos, com ciclos de 30 segundos, por meio do desenvolvimento de método de EAU semiautomático.

### 3.4.2 Extração assistida por enzima (EAE)

A EAE é também considerada uma técnica verde e se beneficia das vantagens dos processos de hidrólise enzimática para ajudar na liberação de compostos para o solvente de extração. Essa extração consiste no uso de enzimas que hidrolisam a membrana celular liberando o composto de interesse para o meio aquoso, ocorrendo também a lise dos complexos moleculares lipoproteína e lipopolissacarídeo, liberando compostos que não são possíveis extrair por métodos mecânicos (BAIANO, 2014; ARAUJO et al., 2019).

Na EAE a água é empregada como meio reacional, por isso, essa técnica é uma alternativa promissora aos métodos convencionais de extração que empregam solventes orgânicos (BAIANO, 2014; ASSANVO et al., 2016). A EAE está fundamentada principalmente na capacidade das enzimas de catalisar reações, com especificidade e seletividade, em condições de incubação favoráveis à enzima. A EAE apresenta vantagens em relação aos métodos de extração convencionais por possuir apelo ecológico já que nesta técnica não são utilizados solventes orgânicos. Além disso, o tempo gasto nas operações de hidrólise enzimática pode ser menor, pois neste caso, a etapa de remoção do solvente orgânico não existe e o produto final apresenta maior qualidade devido à ausência de resíduos de solventes (GARDOSSI et al., 2010).

Entretanto, para obter razoável eficiência do processo, é necessário compreender parâmetros bioquímicos relacionados às enzimas, como modo de ação, propriedade catalítica, condições ótimas de atuação e quais enzimas ou

combinação delas são mais adequadas para a obtenção dos compostos de interesse (PURI; SHARMA; BARROW, 2012; KUMAR et al., 2017).

Devido às suas vantagens, a EAE tem despertado o interesse de vários pesquisadores na busca por combinações de diferentes enzimas para agir na desconstrução da parede celular de matrizes alimentares. No entanto, essa é uma técnica que do ponto de vista da escala industrial apresenta limitações, devido ao elevado custo para o processamento de grandes volumes de matéria-prima e a disponibilidade de preparações enzimáticas, que podem não hidrolisar completamente as paredes celulares da matriz alimentícia (LIU et al., 2016).

Cabe ressaltar que a liberação de compostos bioativos de células por desconstrução enzimática pode ser otimizada usando preparações enzimáticas únicas ou combinadas (TEIXEIRA et al., 2013; ARAUJO et al., 2019). A combinação das enzimas amilase, celulase e protease foi mencionada (SHARMA; GUPTA, 2001; FANG; MOREAU, 2014) por melhorar o rendimento da extração de óleo a partir do farelo de arroz e do trigo. A combinação das enzimas  $\alpha$ -amilase e celulase tem sido usada para a recuperação de ácidos fenólicos a partir da cevada (YU; VASANTHAN; TEMELLI, 2001).

Por fim, as enzimas podem ser de origem bacteriana, fúngica, animal ou vegetal e, para assegurar que haja um bom rendimento de extração, as condições operacionais como temperatura, tempo, pH e relação enzima-substrato necessitam ser investigadas (KUMAR et al., 2017).

### 3.5 ÓLEO VEGETAL COMO SOLVENTE

A literatura científica destaca que os óleos vegetais estão se mostrando como bons solventes para a extração de carotenoides. A grande vantagem é que não é necessária a separação do óleo comestível do extrato final obtido (SUN; TEMELLI, 2006; BORGUINI et al., 2020). Embora não existam padrões oficiais para o uso dos óleos vegetais como alternativa aos solventes à base de petróleo, esses apresentam propriedades ideais de um solvente verde para minimizar os impactos ambientais durante o seu ciclo de vida (CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007).

Cabe ressaltar que óleos vegetais têm sido usados com sucesso como solventes para a extração de carotenoides de matrizes como crustáceos, cenouras frescas e também na extração de aromas de manjeriço (HANDAYANI; INDRASWATI; ISMADJI, 2008; PU et al., 2010; GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2014). Da mesma forma, os óleos vegetais têm sido enriquecidos com diversos produtos como aromas, polifenóis, antioxidantes e pigmentos, que conferem aos óleos melhor estabilidade oxidativa e notáveis qualidades sensoriais. As extrações com solventes de óleo vegetal têm sido associadas à várias tecnologias inovadoras como ultrassom, micro-ondas e extração com fluido supercrítico (MA et al., 2008; LI et al., 2013; PADUANO et al., 2014).

Os óleos vegetais são sistemas lipofílicos apolares cuja composição varia consideravelmente de acordo com a sua origem, qualidade e métodos de obtenção. Comumente usados na indústria alimentícia e em produtos cosméticos, também podem ser aplicados em campos de extração como por exemplo, na obtenção de fitoquímicos bioativos a partir de recursos naturais (CHUTIA; MAHANTA, 2021). No estudo realizado por Japón-Luján e Castro (2008) foi notado que o uso de óleos vegetais como solvente e micro-ondas como método de extração proporcionaram uma melhoria na eficiência de extração de compostos bioativos, sem que ocorresse a degradação ou a contaminação do óleo.

### **3.5.1 Oleína de palma**

No presente trabalho foi selecionada a oleína de palma para realizar as extrações devido às suas boas características físico-químicas e também porque o estado do Pará é o maior produtor de óleo de palma do Brasil (SANTOS et al., 2017). A oleína é um produto obtido por fracionamento natural do óleo de palma refinado, que apesar de sua origem, possui propriedades físicas que a diferem apreciavelmente do óleo refinado de palma. À temperatura ambiente a oleína apresenta-se na fase líquida, podendo apresentar precipitação de triglicerídeos de maior ponto de fusão caso seja armazenado em ambientes frios. Outra característica é a capacidade de se misturar facilmente a qualquer outro óleo de oleaginosas (SANTOS et al., 2017; ABRAPALMA, 2021).

A oleína de palma é extensamente utilizada em cadeias de *fast-food* para frituras em geral. No preparo desses alimentos, por fritura em imersão, condições severas são utilizadas através de altas temperaturas. Sob tais condições, um óleo líquido insaturado torna-se inadequado, a menos que seja hidrogenado, para aumentar a sua estabilidade à oxidação. O uso da oleína de palma é preferido, pois tem boas propriedades físicas e maior estabilidade à oxidação em virtude da sua composição de ácidos graxos e antioxidantes naturais como o tocoferol, e também por ser um processo mais vantajoso em função do rendimento de extração de óleo de palma (DENPASA, 2021).

Cabe destacar também que a oleína de palma na sua composição natural em ácidos graxos também requer uma mínima modificação química para uso em uma grande variedade de formulações alimentícias. Na Tabela 2 são apresentados os percentuais de alguns dos ácidos graxos presentes na oleína de palma.

**Tabela 2.** Composição em ácidos graxos da oleína de palma

Composição em ácidos graxos	(%)
Ácido Láurico (C12:0)	0,18 ± 0,01
Ácido Mirístico (C14:0)	0,71 ± 0,07
Ácido Palmítico (C16:0)	41,86 ± 0,50
Ácido Palmitoleico (C16:1)	0,14 ± 0,03
Ácido Esteárico (C18:0)	4,86 ± 0,06
Ácido Oleico (C18:1)	42,09 ± 0,42
Ácido Linoleico (C18:2)	8,67 ± 0,12
Ácido Linolênico (C18:3)	0,22 ± 0,02
Ácido Araquídico (C20:0)	0,37 ± 0,02

Fonte: Corsini et al. (2008)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Coproduto do camarão-rosa

O coproduto resultante do processamento do camarão-rosa (*Farfantepenaeus subtilis*) utilizado neste estudo foi o cefalotórax (Figura 7). Esse material foi obtido de dois lotes de processamento, sob a forma de blocos congelados, junto à indústria processadora de pescado Amasa S/A, localizada em Belém-PA. O coproduto foi acondicionado em embalagem flexível de plástico e transportado para o Laboratório de Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pará (LCTA-UFGPA). As amostras, ainda congeladas, foram divididas em porções de 2 kg e armazenadas a -18 °C até a sua utilização.



**Figura 7.** Cefalotórax do camarão-rosa (*Farfantepenaeus subtilis*)

#### 4.1.2 Reagentes

O padrão de astaxantina (pureza  $\geq 92$  %, código A9335), o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) e o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Para a extração verde foi utilizado como solvente oleína de palma refinada (POO-RBD), fornecida pela empresa Agropalma S/A, (Belém, Brasil). Os reagentes foram estocados a temperatura ambiente (25 °C) em local seco e escuro. Para a extração



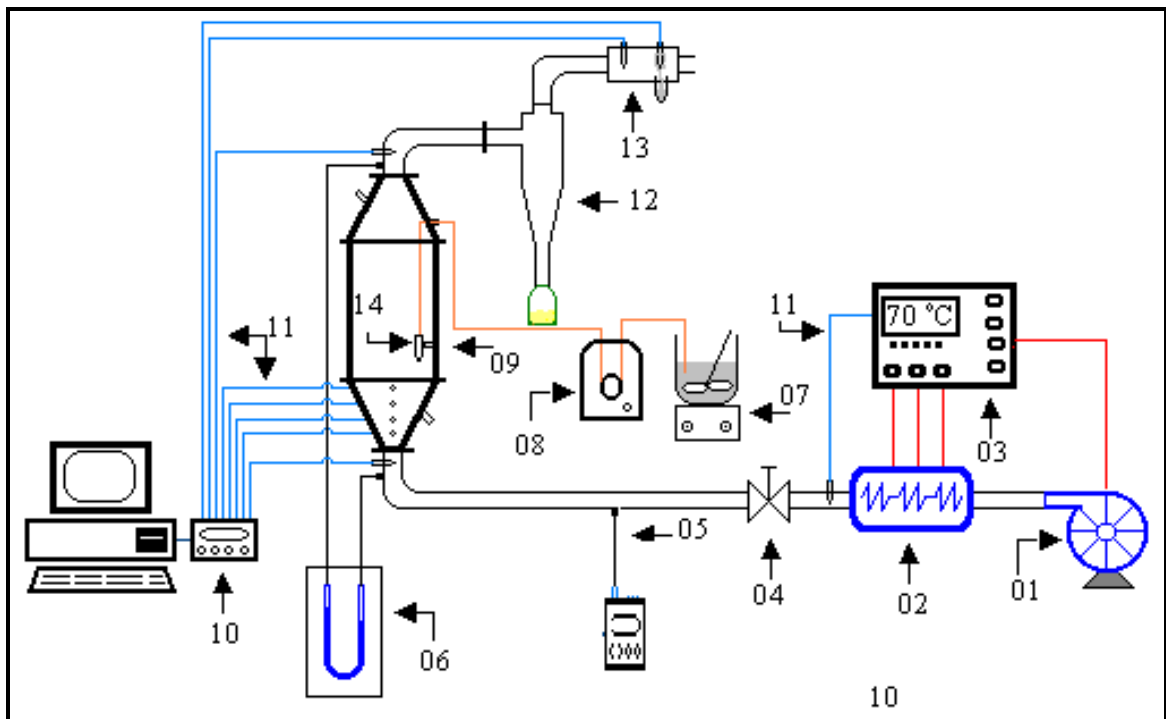
assistida por enzima foram utilizadas as enzimas proteolíticas Alcalase (código 2.4 L FG, atividade declarada de 2,4 Unidades Anson/ g) e Flavourzyme 1000 L (atividade declarada de 1000 Unidade Leucina Aminopeptidase/ g), que foram gentilmente doadas pela Novozymes Latin America Ltda. (Araucária, Brasil). Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram todos de grau analítico.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Sistemas experimentais

#### 4.2.1.1 Sistema experimental para a secagem do coproduto

O processo de secagem foi realizado em um secador do tipo leito de jorro cônico, construído e instalado no LCTA-UFGA, de acordo com a Figura 8.



**Figura 8.** Representação do sistema experimental da secagem do coproduto

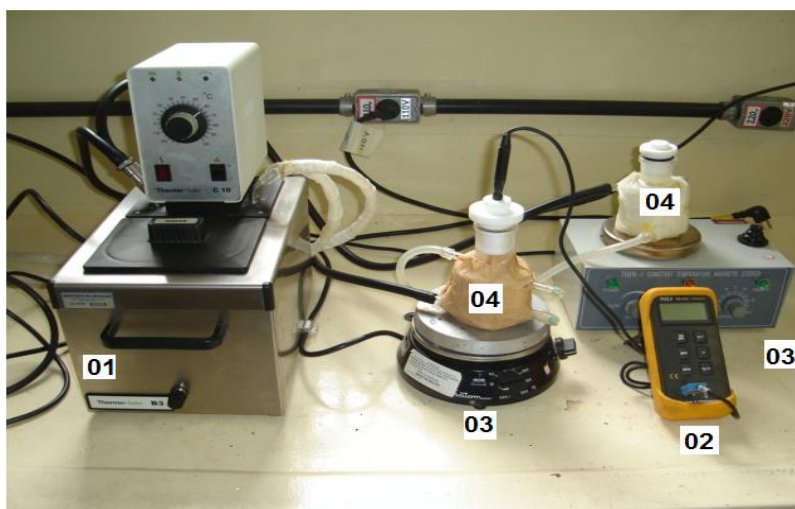
Fazem parte do sistema experimental de secagem os seguintes componentes: soprador centrífugo de ar (01); aquecedor elétrico (02); controlador de corrente elétrica (03); válvula gaveta (04); ponto de tomada da velocidade do ar (05); manômetro (06); agitador (07); bomba peristáltica (08); leito de jorro (09); unidade de

monitoramento e aquisição de dados (10); termopar (11); ciclone (12); psicrômetro (13) e bico ejetor de suspensão (14).

Cabe destacar que o secador leito de jorro consiste em uma base cônica em aço inoxidável, com ângulo incluso de 60°, diâmetro do orifício de entrada de 0,05 m e diâmetro superior de 0,20 m. Acoplado à base cônica está um corpo cilíndrico de vidro com 0,005 m de espessura, 0,20 m de diâmetro e 0,30 m de altura. A parte superior do secador é composta por outro cone em aço inoxidável com ângulo de 45°, dotada de um orifício por onde é introduzida a mangueira de injeção da suspensão posicionada, aproximadamente, a 0,10 m acima da superfície do leito estático de partículas. Na entrada da base cônica inferior, uma tela de aço foi colocada para sustentar e evitar a queda das partículas inertes em repouso. As tomadas de pressão estão localizadas na base cônica inferior e superior, enquanto que as tomadas de temperatura estão localizadas na tubulação de entrada do secador e na saída do ciclone de coleta do material seco. O material inerte utilizado para preencher o leito estático foram partículas de polipropileno com diâmetro médio de 0,36 cm, esfericidade de 0,85 e densidade de 0,905g/ cm<sup>3</sup>.

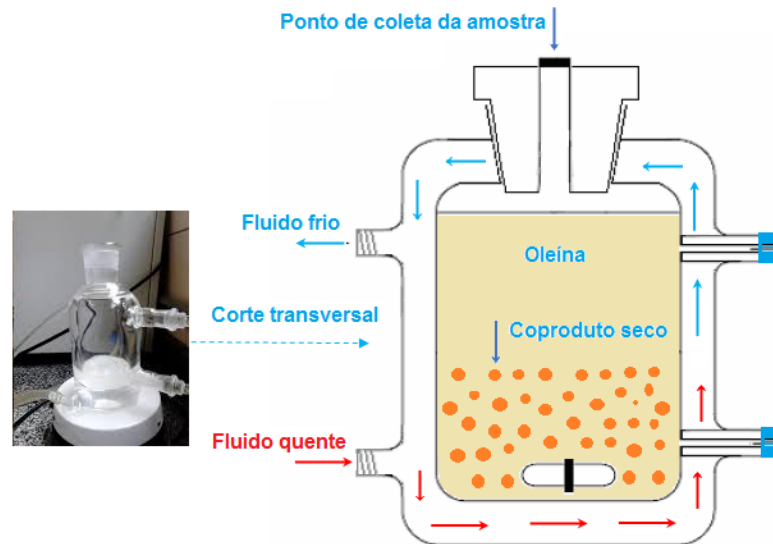
#### 4.2.1.2 Sistema experimental para a extração da ASX do coproduto em pó

No processo de extração da ASX, utilizando oleína de palma refinada como solvente, o sistema experimental para tal encontra-se na Figura 9.



**Figura 9.** Sistema experimental de extração de ASX do coproduto em pó

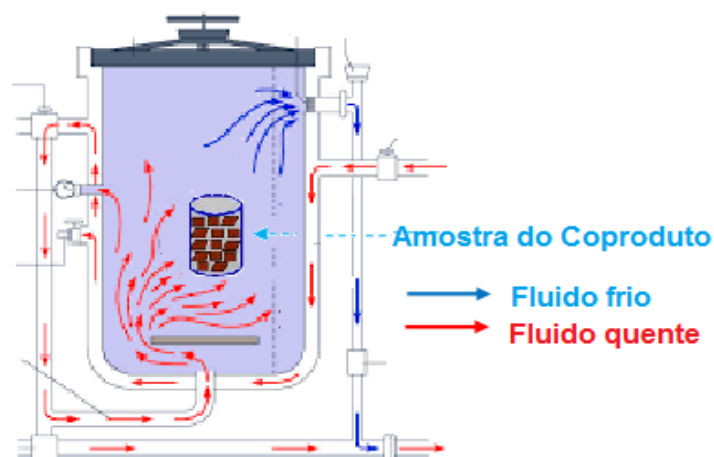
Fazem parte desse sistema de extração os seguintes componentes: banho ultra termostático com circulação (01); controlador de temperatura (02); agitador magnético com aquecimento (03); e reator de vidro encamisado (04). Na Figura 10 é possível observar mais detalhes deste mecanismo.



**Figura 10.** Detalhes da extração no reator de vidro encamisado

#### 4.2.1.3 Sistema experimental para o processo de cocção do coproduto

No processo de cocção do coproduto do camarão-rosa foi utilizada uma autoclave vertical para ensaios em laboratório (Prismatec, Linha CS, Brasil) com capacidade de 30 litros. A Figura 11 representa o sistema operacional dessa etapa de tratamento térmico das amostras.



**Figura 11.** Representação do sistema experimental de cocção do coproduto

Esta etapa foi realizada de acordo com a metodologia de Niamnuy, Kerdpi boon e Devahastin (2012) com modificações, onde uma massa de 1 kg de coproduto foi descongelada sob refrigeração (10 °C) e acondicionada em embalagem flexível autoclavável, e então, submetida a um processo de cocção na temperatura de 100 °C durante 10 minutos em autoclave (Prismatec, Linha CS, Brasil) (Figura 11). Ao final do tempo de cocção, a amostra foi resfriada em temperatura ambiente (25 °C), triturada e homogeneizada em processador de alimentos de bancada do tipo faca (Philips Walita, RI7625, Brasil) até a formação de uma pasta homogênea. A pasta resultante foi acondicionada em potes de vidro com tampa e armazenada em freezer a -18 °C até a sua utilização. Cabe também mencionar que uma outra amostra de coproduto (1 kg), não submetida ao processo de cocção, foi triturada, homogeneizada e armazenada nas mesmas condições descritas acima. A amostra tratada termicamente foi codificada como CCTT (coproduto com tratamento térmico), enquanto que a amostra sem tratamento térmico foi codificada como CSTT (coproduto sem tratamento térmico).

#### **4.2.2 Composição do coproduto do camarão-rosa**

Esta caracterização foi realizada nas amostras CCTT, CSTT e nos coprodutos em pó obtidos nas diferentes temperaturas de secagem. As análises realizadas foram: umidade (método nº 920.151), proteína bruta (método nº 920.152), lipídio total (método nº 968.20) e teor de cinzas (método nº 940.26). Todas as análises foram efetuadas em triplicata e seguindo as recomendações da AOAC (1997).

#### **4.2.3 Análise granulométrica do coproduto em pó**

A granulometria do produto seco em leite de jorro foi determinada de acordo com a metodologia da AOAC (1997), método 965.22, utilizando um conjunto de peneiras padronizadas com o intuito de obter a sua distribuição granulométrica. A partir da massa de amostra retida em cada peneira foi calculado o diâmetro médio equivalente de *Sauter* de acordo com a Equação 1.

$$DP_s = \frac{1}{\sum_{n=1}^i (\Delta X_i) / DP_i} \quad (1)$$

Onde  $DP_s$  é o diâmetro médio de *Sauter*,  $DP_i$  é o diâmetro médio aritmético entre a abertura de duas peneiras e  $\Delta X_i$  é a fração em peso do tamanho de partículas  $DP_i$ .

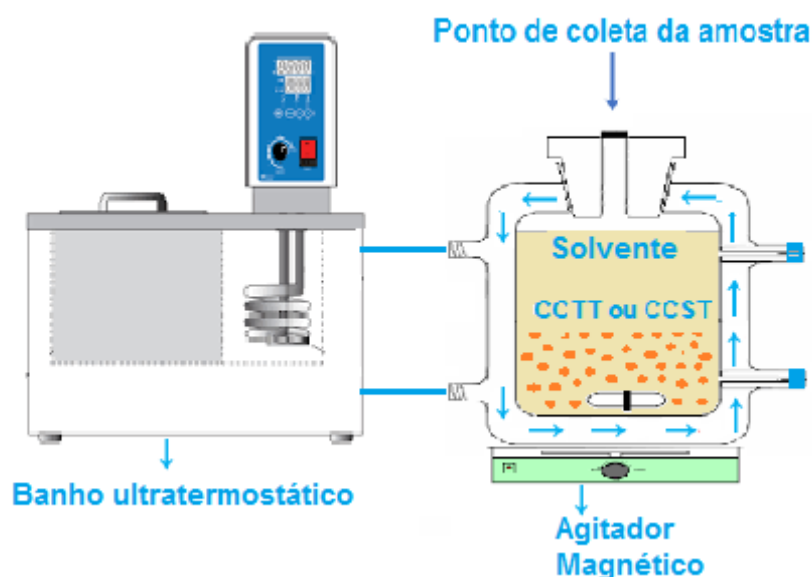
#### 4.2.4 Extração do carotenoide astaxantina

Este estudo tem como objetivo extrair o carotenoide ASX localizado no cefalotórax do *Farfantepenaeus subtilis* com a aplicação do conceito verde de extração. Essa aplicação pode tornar este coproduto mais atrativo e assim, favorecer a sua utilização como ingrediente alimentar. Nesse sentido, as ações voltadas à extração da ASX foram divididas na aplicação de três processos de extração distintos: o primeiro foi realizado com a aplicação de solventes orgânicos (extração convencional), o segundo foi realizado com a aplicação da oleína de palma como solvente verde, e o terceiro processo foi realizado através da combinação de dois métodos não-convencionais: extração assistida por enzima (EAE) e extração assistida por ultrassom (EAU).

##### 4.2.4.1 Extração convencional de astaxantina

Esta extração foi realizada conforme a metodologia de Mezzomo et al. (2011), onde 5 g das amostras CCTT e CSTT foram homogeneizadas com 200 mL de uma mistura de solventes orgânicos (éter de petróleo, acetona, água, 15:75:10) por 6 horas a 5 °C em reator de vidro encamisado, conectado a um banho ultra termostático com circulação (Thermo Haake, Haake F3 fisions CH, EUA) e agitação a 100 rpm, utilizando uma placa de agitação (Flsatom, 752A, Brasil) (Figura 12). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Fanem, Excelsa 280-R, Brasil) a 1520 g por 5 minutos a 20 °C e os sobrenadantes foram coletados. Os precipitados foram novamente homogeneizados com 200 mL da mistura de solventes por mais 6 horas a 5 °C com intuito de obter a completa despigmentação das amostras. Ao final desta

segunda extração, os sobrenadantes de cada amostra foram reunidos em um funil de decantação para a remoção da fase aquosa. Por fim, os extratos obtidos foram concentrados sob vácuo em um evaporador rotativo (Quimis, Q344B, Brasil) a 40 °C.



**Figura 12.** Detalhe do funcionamento da extração convencional

A quantificação da ASX foi realizada por espectrofotometria UV/VIS a 468 nm (Nova Instruments, NI 2000, Brasil) utilizando éter de petróleo como branco. A concentração de ASX foi calculada pela Equação 2 (SIMPSON; HAARD, 1985) e expressa como  $\mu\text{g/g}$  de coproduto.

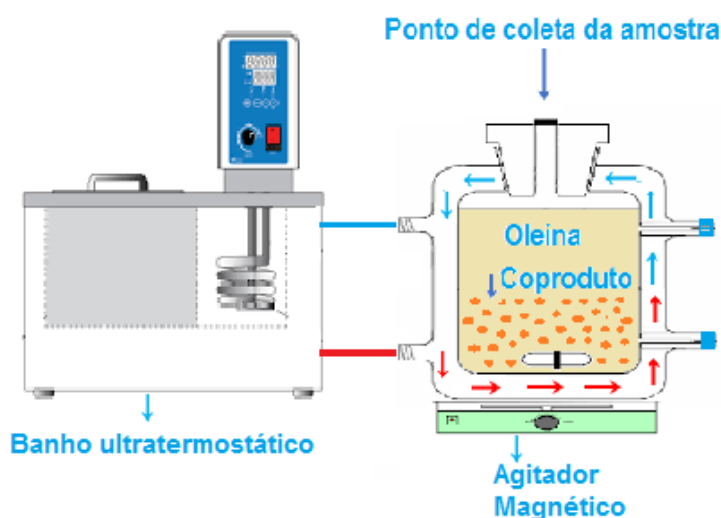
$$\text{Astaxantina } (\mu\text{g/g}) = \frac{A \times V \times D}{0,2 \times W} \quad (2)$$

Onde A é a absorbância do extrato, V é o volume do extrato (mL), D é o fator de diluição, 0,2 é a  $A_{468\text{nm}}$  de 1  $\mu\text{g}$  de ASX padrão/ mL de solvente (éter de petróleo), e W é a massa da amostra (g).

Nesta etapa do estudo foi estabelecido que, entre as duas amostras dos coprodutos CCTT e CSTT, a que apresentasse a maior disponibilidade do carotenoide ASX pela aplicação da extração convencional, seria selecionada para dar continuidade aos ensaios posteriores.

#### 4.2.4.2 Extração da astaxantina com oleína de palma

As extrações do pigmento ASX do coproduto de camarão-rosa, secos em leite de jorro, foram realizadas utilizando a metodologia descrita por Handayani, Indraswati e Ismadji (2008). As extrações foram efetuadas utilizando 90 mL de oleína em três diferentes temperaturas (50, 60 e 70 °C). A oleína foi introduzida em um reator de vidro encamisado conectado à um banho ultra termostático com circulação (Thermo Haake, Haake F3 fisions CH, EUA) (ver Figura 13). Após atingir a temperatura desejada, 2,5 g de coproduto em pó foi homogeneizado com a oleína e então, a suspensão foi agitada a 100 rpm utilizando uma placa de agitação (Flisatom, 752A, Brasil) e agitador magnético. Uma alíquota de 3 mL da suspensão foi coletada em intervalos regulares de 15 minutos e centrifugada a 1520 g por 5 minutos a 20 °C e o sobrenadante foi coletado e utilizado na determinação da concentração de ASX. Este procedimento foi realizado até que a concentração de ASX no extrato oleoso se tornasse constante.

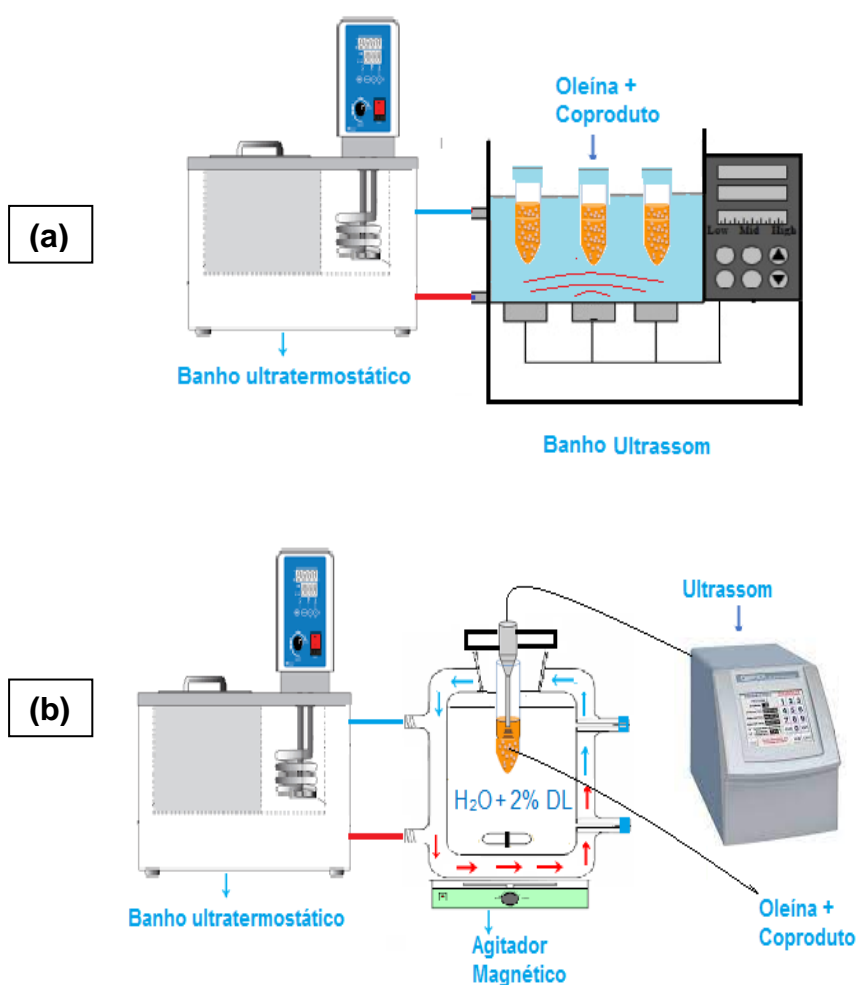


**Figura 13.** Detalhe do funcionamento da extração com oleína de palma

#### 4.2.4.3 Extração da astaxantina assistida por enzima e ultrassom

Nesta ação foi utilizada a amostra que apresentou a maior disponibilidade do carotenoide ASX pela aplicação da extração convencional empregando solvente orgânico, como mencionado anteriormente no item 4.2.4.1. Cabe também informar

que aqui foi efetuado um teste preliminar para selecionar o melhor sistema de ultrassom a ser usado na extração de ASX, que foi realizado em três etapas. Nesse teste foram utilizados dois sistemas a saber: um ultrassom do tipo banho (Figura 14a) e um ultrassom de ponteira (Figura 14b). O intuito desta ação foi de avaliar qual desses dois sistemas possibilitaria obter a maior disponibilidade de ASX pela aplicação dos fenômenos produzidos pelo ultrassom em diferentes equipamentos. Assim, o sistema que proporcionou a maior eficiência de recuperação deste carotenoide foi selecionado para dar continuidade aos ensaios seguintes.



**Figura 14.** Ultrassom de banho (a) e de ponteira (b)

A primeira etapa do teste preliminar consistiu em submeter a amostra de coproduto selecionado no item 4.2.4.1 a uma hidrólise enzimática, realizada conforme o procedimento descrito por Sila et al. (2014), com modificações, cujos parâmetros estão apresentados na Tabela 3.



**Tabela 3.** Parâmetros do tratamento enzimático (teste preliminar)

Ensaio	Tempo de hidrólise (min.)	Concentração de enzima (%)
1	60	0,2
2	90	0,2
3	60	0,4
4	90	0,4
5	60	0,6
6	90	0,6

Nesta ação foi utilizada a enzima alcalase como catalisador das reações de hidrólise, em que uma amostra de 50 g do coproduto selecionado foi diluída em 100 mL de solução tampão citrato-fosfato (pH 8), em duplicata. Na sequência, a alcalase foi adicionada à suspensão conforme as concentrações da Tabela 3 (porcentagem de enzima em relação à massa da amostra, m/v) e homogeneizadas. As amostras foram incubadas em agitador orbital (Marconi, MA832/1, Brasil) a 50 °C e submetidas à agitação numa velocidade de 150 rpm. Ao final da incubação, as amostras foram aquecidas em banho-maria (Nova Instruments, NI 1217, Brasil) por 5 minutos a 90 °C para desnaturar a enzima e cessar a atividade hidrolítica. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g (Fanem, Excelsa 280-R, Brasil) durante 10 minutos a 5 °C e a fase sólida (precipitado) foi recolhida e utilizada na segunda etapa de extração da ASX.

Na segunda etapa deste teste, a fase sólida obtida acima foi utilizada para a extração da ASX, que foi realizada usando oleína como solvente verde. Nesta etapa, a extração de ASX assistida por banho ultrassom foi efetuada nas condições propostas por Sachindra e Mahendrakar (2005), com modificações, onde as amostras hidrolisadas da primeira etapa (fase sólida) foram homogeneizadas com oleína na proporção de 1:2 (m/v) e submetidas à sonicação em ultrassom de banho (Unique, modelo USC 1450, Brasil) (Figura 14a) com frequência constante de 25 kHz, por 30 minutos. O banho ultrassom foi preenchido com água destilada até o nível indicado pelo fabricante e a temperatura desta foi mantida a  $20 \pm 1$  °C através de um banho ultra termostático (Thermo Haake, Haake F3 fisions CH, EUA). Ao final das extrações, as amostras foram centrifugadas a 1520 g durante 30 minutos e os

extratos oleosos (sobrenadantes) foram coletados em frascos de vidro âmbar, que foram hermeticamente fechados e adicionados de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) e armazenados a -18 °C até o momento das análises.

Na terceira etapa deste teste realizamos a recuperação de ASX assistida por ultrassom de ponteira de acordo com a metodologia de Li et al. (2013), com modificações, sendo utilizado um sonicador com frequência constante de 20 kHz (Q Sonica, Q700, EUA) com uma sonda (ponteira) de alta intensidade acoplada, com 3,2 mm de diâmetro de ponta (Figura 14b). A amostra hidrolisada (fase sólida) obtida na primeira etapa foi homogeneizada com oleína na proporção de 1:10 (m/v) em um tubo *falcon* (15 mL), que foi fixado em um reator de vidro encamisado com capacidade para 250 mL contendo água destilada + 2 % de detergente neutro líquido solubilizado. A temperatura do interior do reator foi mantida a 20 ± 1,0 °C utilizando um banho de circulação (Thermo Haake, Haake F3 fisions CH, EUA) e um agitador magnético. A distância entre a extremidade inferior da sonda e o fundo do tubo foi padronizada em 2 cm. A sonicação ocorreu a 80 % de amplitude, com duração de 60 segundos, em ciclo pulsado, onde a cada 10 segundos de sonicação houve uma pausa (pulso) de 5 segundos. Os pulsos foram utilizados para que fosse evitado o aquecimento excessivo da amostra e a consequente degradação da ASX pelo calor. A recuperação e o armazenamento dos extratos oleosos foram realizados da mesma forma que na extração com o banho ultrassom, descritos anteriormente.

Cabe destacar que, com os resultados obtidos nos testes preliminares, para a seleção do sistema de sonicação, foi então possível definir um único sistema de EAU visando a recuperação da ASX do coproduto do camarão-rosa, bem como a inclusão de novos parâmetros para o tratamento enzimático. Sendo assim, na Tabela 4 temos os novos parâmetros do tratamento enzimático, onde foi adicionado um tempo maior de hidrólise (120 minutos) e uma concentração maior de enzima (0,8 %) para avaliar se a recuperação de ASX seria melhorada. É importante destacar que a concentração de 0,2 % foi descartada dos ensaios, já que esta mostrou um desempenho pouco satisfatório no teste preliminar.

Nesta última e definitiva extração assistida por enzima e ultrassom, uma amostra de CCTT foi submetida a hidrólise enzimática conforme o procedimento descrito por Sila et al. (2014), com modificações, cujo os parâmetros estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros definitivos do tratamento enzimático

Ensaio	Tempo de hidrólise (min.)	Concentração de enzima (%)
1	60	0,4
2	60	0,6
3	60	0,8
4	90	0,4
5	90	0,6
6	90	0,8
7	120	0,4
8	120	0,6
9	120	0,8

Nesta etapa de hidrólise definitiva utilizamos as enzimas alcalase, flavourzyme e uma mistura de alcalase e flavourzyme na proporção de 1:1 (v/v). Uma amostra de 50 g do coproduto CCTT foi diluída em 100 mL de solução tampão citrato-fosfato (pH 8), e então, as enzimas foram adicionadas conforme as concentrações da Tabela 4 (porcentagem de enzima em relação à massa da amostra, m/v). Cada ensaio de hidrólise enzimática foi realizado em duplicata. As amostras foram agitadas e incubadas em agitador orbital (Marconi, MA832/1, Brasil) a 50 °C e velocidade de agitação de 150 rpm. Ao final da incubação, as amostras foram aquecidas em banho-maria (Nova Instruments, NI 1217, Brasil), por 5 minutos a 90 °C, para desnaturar as enzimas e cessar a atividade hidrolítica. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g (Fanem, Excelsa 280-R, Brasil) durante 10 minutos a 5 °C e a fase sólida (precipitado) foi recolhida e utilizada na extração da ASX. Cabe destacar que além dos experimentos efetuados aplicando as condições da Tabela 4, três ensaios controles (sem adição de enzima) foram realizados nos diferentes tempos de incubação (60, 90 e 120 minutos), para efeito de comparação.

É importante ressaltar que a protease comercial alcalase tem sido frequentemente utilizada na hidrólise de coprodutos de crustáceos para a obtenção de ASX (HOLANDA; NETTO, 2006; VIEIRA; OLIVEIRA; KUROSZAWA, 2016; ANTUNES-VALCAREGGI et al., 2017), entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos

da flavourzyme para esta mesma finalidade, ainda que seja comum a utilização desta na produção de hidrolisados proteicos.

A extração da ASX das amostras CCTT hidrolisadas, cuja umidade era de  $63,87 \pm 0,14$  %, foi efetuada pelo sonicador de ponteira, seguindo a metodologia de Li et al. (2013) com modificações. Ao final das extrações, as amostras foram centrifugadas a 1.800 g durante 30 minutos e os extratos oleosos (sobrenadantes) foram coletados em frascos de vidro âmbar, hermeticamente fechados e adicionados de gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), e armazenados a -18 °C até o momento das análises.

#### 4.2.5 Análises físico-químicas nos extratos oleosos

##### 4.2.5.1 Quantificação da astaxantina e eficiência de recuperação ( $\eta$ )

Uma solução de ASX com concentração de 13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi preparada utilizando o padrão sintético de ASX e oleína de palma como solvente. Em seguida, o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx.}} = 485 \text{ nm}$ ) foi encontrado através da varredura dessa solução em espectrofotômetro UV/VIS (Thermo Scientific, Evolution 60S, EUA) nos comprimentos de onda entre 400 e 600 nm (ver Apêndice 1), e o coeficiente de extinção (E) foi calculado através da Equação 3 (CHEN; MEYERS, 1984). As leituras das absorbâncias dos extratos oleosos foram realizadas em 485 nm, utilizando oleína de palma como branco. A concentração de ASX encontrada nos coprodutos hidrolisados foi calculada conforme a Equação 4 (PU, BECHTEL; SATHIVEL, 2010) e expressa como  $\mu\text{g}/\text{g}$  de coproduto hidrolisado.

$$\text{Coeficiente de extinção (E)} = 7,4428 \times 10^{13} \times \lambda_{\text{máx.}}^{-3,9311} \quad (3)$$

$$\text{Astaxantina } (\mu\text{g/g de coproduto hidrolisado}) = \frac{A \times V \times D \times 10^6}{100 \times W \times E} \quad (4)$$

Onde A é a absorbância do extrato, V é o volume do extrato (mL), D é o fator de diluição, W é a massa da amostra em gramas e E é o coeficiente de extinção.

A eficiência de recuperação ( $\eta$ ) da ASX foi calculada através da Equação 5 e expressa em porcentagem (%).

$$\text{Eficiência de recuperação (\%)} = \left( \frac{ASX_{\text{ultrassom}}}{ASX_{\text{convencional}}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde  $ASX_{\text{ultrassom}}$  é a concentração de ASX no coproduto hidrolisado obtido através da Equação 4 e  $ASX_{\text{convencional}}$  é a concentração de ASX encontrada na extração convencional (Equação 2).

#### 4.2.5.2 Análise colorimétrica

Esta análise foi realizada utilizando um colorímetro tristímulo (Minolta, Chromo CR-400, Japão) com iluminante D65, ângulo de observação de 10° e calibração em placa branca. Foram realizadas as leituras dos seguintes parâmetros: luminosidade ( $L^*$ ), transição da cor verde ( $-a^*$ ) para o vermelho ( $+a^*$ ), transição da cor azul ( $-b^*$ ) para a cor amarela ( $+b^*$ ), croma ( $C^*$ ) e ângulo de tonalidade ( $h^*$ ). A diferença total de cor ( $\Delta E$ ) foi calculada de acordo com a Equação 6:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (6)$$

#### 4.2.5.3 Determinação do perfil de ácidos graxos

Na determinação do perfil de ácidos graxos do coproduto em pó foi empregada a metodologia proposta por Lepage e Roy (1984). Para os extratos oleosos, o perfil de ácidos graxos foi determinado utilizando a metodologia proposta por Rodrigues, Darnet e Silva (2010). Nas duas metodologias, os ácidos graxos de ésteres metílicos (FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*) foram obtidos por meio de uma transesterificação direta, sem a etapa de extração dos lipídios totais. Os FAMES obtidos foram diluídos em iso-octano, acondicionados em um frasco de vidro âmbar, hermeticamente lacrado sob atmosfera modificada com  $N_2$  e posteriormente armazenados a -10 °C até o momento das análises cromatográficas.

A separação e identificação dos FAMES foi realizada em um cromatógrafo gasoso (Varian, modelo CP 3380, EUA) equipado com detector de ionização de chama e com uma coluna capilar CP-Sil 88 (comprimento 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm; Varian Inc., EUA). As condições operacionais foram: hélio como gás de arraste e uma taxa de fluxo de 0,9 mL/ min., um detector FID a 250 °C, um injetor (razão de divisão 1:100) a 250 °C e um volume de injeção de 1 µL. A temperatura programada da coluna foi de 175 °C por 8 min., seguida por 2 °C/ min. até 180 °C por 28 min., e então, 2 °C/ min. até 250 °C por 10 min. Os picos de ácidos graxos individuais foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os de misturas conhecidas de ácidos graxos padrão (Nu-check-prep., Inc., EUA) sob as mesmas condições de operação. O tempo de retenção e a área de cada pico foram calculados usando o *software Varian Star 3.4.1.* (VARIAN CIENTIFICO, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagens relativas de ácidos graxos totais.

#### 4.2.5.4 Análise de estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa da oleína e dos extratos oleosos foi medida utilizando um equipamento Rancimat (Metrohm, 743, Suíça) pelo método Cd12b-92 da AOCS (2001), onde 3 g de cada amostra, em duplicata, foram aquecidas a uma temperatura de 110 °C, através de um bloco de aquecimento e, simultaneamente, borbulhadas com um fluxo de ar contínuo de 20 L/ h. O ar de saída, contendo ácidos orgânicos voláteis provenientes das amostras, foi coletado em um recipiente de medição contendo 40 mL de água ultrapura. A condutividade da água ultrapura foi medida automaticamente pelo equipamento e a análise seguiu até a completa oxidação das amostras. O tempo de indução (TI), que foi medido em horas, corresponde ao período decorrido entre o início do teste e um aumento súbito na condutividade da água ultrapura. A ampliação do TI dos extratos em relação à oleína (amostra sem ASX), foi calculada segundo a Equação 7 e os resultados foram expressos em porcentagem (%).

$$\text{Ampliação do TI (\%)} = \left( \frac{\text{TI}_{\text{extrato}} \times 100}{\text{TI}_{\text{oleína}}} \right) - 100 \quad (7)$$

#### 4.2.5.5 Análise de compostos fenólicos totais (CFT)

A quantificação dos CFT foi realizada na fração polar da oleína e dos extratos oleosos através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Este é um método espectrofotométrico que se baseia na capacidade de redução do ácido fosfomolibdico e fosfotúngstico pelas hidroxilas dos fenóis produzindo uma coloração azul, cuja absorbância é medida em  $\lambda = 760$  nm. As amostras de óleo foram homogeneizadas com metanol 80 % numa proporção de 1:10 (m/v) e então levadas à um agitador orbital (Lucadema, LUCA-222, Brasil) usando velocidade de agitação de 200 rpm, temperatura ambiente (25 °C) e tempo de 60 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1520 g por 30 minutos e os sobrenadantes (fase metanólica) foram coletados e lavados com 10 mL de hexano para a remoção de interferentes lipídicos. Uma curva padrão com ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) foi preparada para calcular os resultados e o metanol 80 % foi usado como branco ( $R^2 = 0,98$ ). Os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalente/ g de extrato oleoso (mg AGE/ g).

#### 4.2.5.6 Atividade antioxidante (AA)

A atividade antioxidante da oleína e dos extratos oleosos foi determinada por espectrofotometria UV/VIS utilizando o método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) descrito por Re et al. (1999). A absorbância das amostras foi medida a 734 nm e uma curva padrão com trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), um análogo da vitamina E, foi preparada para calcular os resultados ( $R^2 = 0,99$ ), que foram expressos como  $\mu\text{M}$  de trolox equivalente/ g de extrato oleoso ( $\mu\text{M TE/ g}$ ).

#### 4.2.5.7 Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica da oleína e dos extratos oleosos foi realizada usando um analisador termogravimétrico (Shimadzu, TGA-50, Japão) sob atmosfera dinâmica de gás nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), seguindo um fluxo de 50 mL/ min. Foi utilizada uma razão de aquecimento constante de 10 °C/ min., iniciando em 25 °C e finalizando em

600 °C. Aproximadamente 10 mg de cada amostra foram depositados em placas de platina e a massa foi constantemente medida durante o aumento gradual da temperatura. Os resultados foram expressos como perda de massa (%) e os gráficos de termogravimetria (TG) e de termogravimetria derivada (DTG) foram gerados com o *software* Origin 8.0 (OriginLab®, EUA).

#### 4.2.6 Modelagem matemática

A modelagem matemática do processo de extração da ASX foi realizada com ajustes de um modelo teórico de um processo de extração sólido-líquido aos dados experimentais, visando prever a cinética de transferência de massa. O modelo utilizado neste estudo está descrito a seguir.

Cabe destacar que o conhecimento da cinética de extração é extremamente relevante na compreensão do fenômeno de separação de um componente, bem como no *design* do processo de extração sólido-líquido (HO; OFOMAJA, 2006).

Neste estudo, o entendimento e predição do processo de extração da ASX em oleína foram fundamentados nos aspectos cinéticos envolvendo apenas a transferência de massa. Na aplicação do modelo teórico foi admitida a transferência de massa como o principal mecanismo no controle da taxa de extração do componente ASX, presente na matriz sólida para a fase líquida. Neste caso, a taxa de transferência de massa da ASX para a fase líquida, matematicamente pode ser descrita pela Equação 8 (HANDAYANI; INDRASWATI; ISMADJI, 2008):

$$\frac{dN_A}{dt} = k_L * A_S * (C_{Ae} - C_A) \quad (8)$$

Onde:  $dN_A/dt$  é a razão de transferência de massa ( $\mu\text{g}/\text{s}$ ),  $C_A$  e  $C_{Ae}$  são as concentrações de ASX na fase líquida (oleína de palma) e no equilíbrio, respectivamente.  $k_L$  é o coeficiente de transferência de massa e  $A_S$  é a área superficial da partícula. Segundo Handayani, Indraswati e Ismadji (2008), nos casos em que o procedimento de extração é realizado em sistema descontínuo (batelada),



e o volume de solução (V) é mantido constante durante o processo, pode-se admitir a Equação 9:

$$dN_A = V * dC_A \quad (9)$$

A substituição da equação 9 na equação 8 resulta nas Equações 10, 11 e 12 abaixo:

$$\frac{V * dC_A}{dt} = k_L * A_S * (C_{Ae} - C_A) \quad (10)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = k_L * \frac{A_S}{V} * (C_{Ae} - C_A) \quad (11)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = k_L * a * (C_{Ae} - C_A) \quad (12)$$

Aplicando as seguintes condições iniciais:

- Para tempo de processo de extração  $t = 0$ , a concentração de ASX na solução base será igual a zero ( $C_A = 0$ );
- Para tempo de processo de extração  $t > 0$ , a concentração de ASX na solução base será  $C_A = C_A$ .

Com isso, a solução analítica da Equação 12 pode ser apresentada na forma da Equação 13:

$$C_A = C_{Ae} * (1 - e^{-k_L * a * t}) \quad (13)$$

Reescrevendo a Equação 13 em termos do rendimento de ASX por massa de coproduto de camarão seco, tem-se a Equação 14:

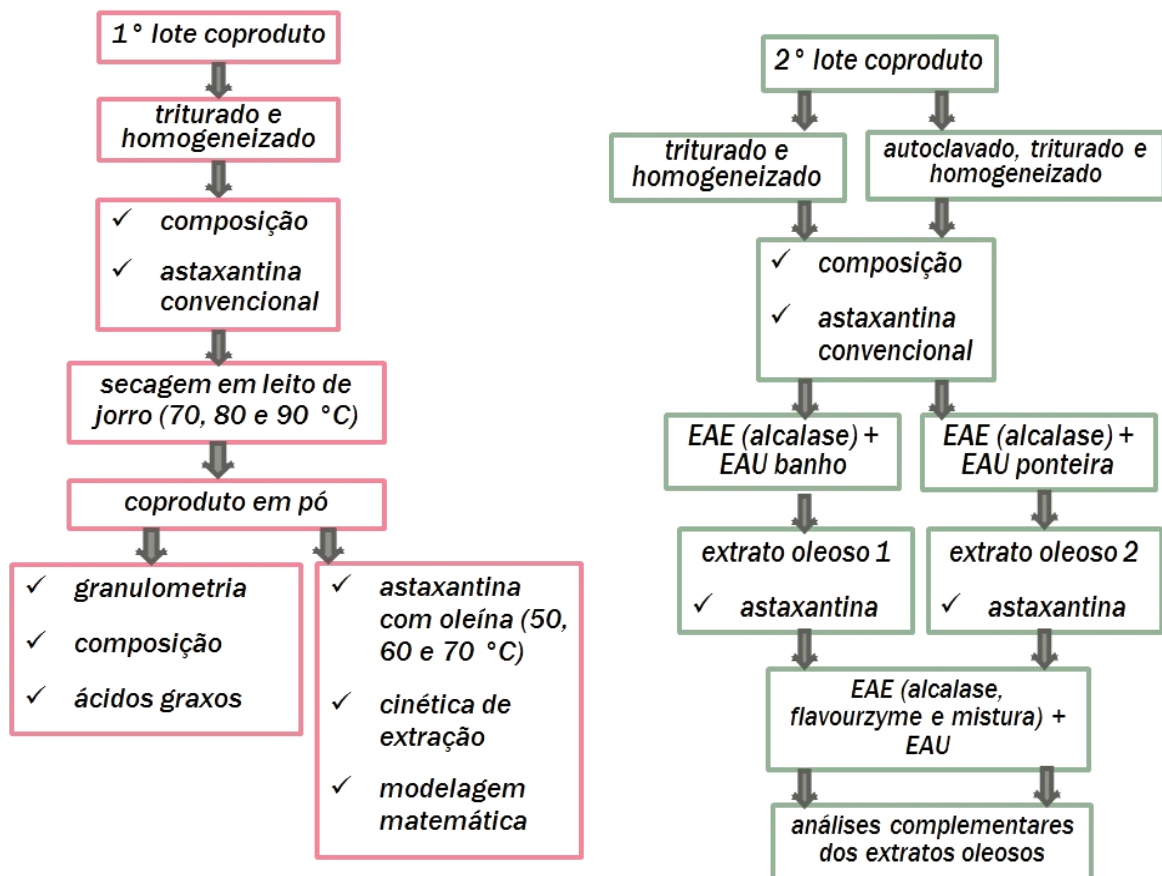
$$Y = Y_e * (1 - e^{-k_L * a * t}) \quad (14)$$

Para o modelo cinético de transferência de massa (Equação 14), os parâmetros  $Y_e$  e  $k_L$  foram estimados através de ajuste utilizando o método dos mínimos quadrados não linear, realizados com os dados da extração experimental.

#### 4.2.7 Análise estatística

Os resultados numéricos das análises representam a média  $\pm$  desvio-padrão de três repetições de cada análise. Os resultados foram submetidos à análise estatística ANOVA fator único com significância de  $p < 0,05$  utilizando o software *Microsoft Excel*® 2013. Os parâmetros do modelo analítico proposto foram estimados por meio do software *Statistica-Windows 7.0* (STATSOFT Inc., EUA). A qualidade de ajuste do modelo proposto para os dados da cinética de extração foi estimada por meio do coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

#### 4.2.8 Resumo esquemático do material e métodos



**Figura 15.** Resumo esquemático do material e métodos

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo foram organizados em quatro tópicos. Cada um deles apresenta um estudo da influência das condições de processo sobre a viabilidade de extração da ASX do coproduto cefalotórax oriundo do processamento do camarão-rosa.

No primeiro tópico é apresentado o estudo da influência das condições de secagem em leito fluidizado do tipo jorro na recuperação da ASX. Os resultados deste primeiro tópico foram publicados na revista *Journal of Food Science and Technology* sob o título: “*Drying and extraction of astaxanthin from pink shrimp waste (Farfantepenaeus subtilis): the applicability of spouted beds*” (DOI: 10.1590/fst.31316). No segundo tópico são apresentados os resultados do pré-tratamento térmico de cocção do coproduto e da seleção do sistema ultrassom (ultrassom de banho ou de ponteira) a ser utilizado na extração definitiva de ASX, associado à hidrólise enzimática com a enzima proteolítica alcalase. No terceiro tópico são apresentados os resultados definitivos da extração assistida por enzima e ultrassom, onde o coproduto do camarão-rosa foi submetido à hidrólise enzimática com as enzimas alcalase, flavourzyme e uma mistura 1:1 (v/v) dessas, combinada com EAU utilizando um sonicador de ponteira. E finalmente, no quarto e último tópico são apresentadas as análises complementares realizadas no extrato oleoso contendo o biocomposto ASX.

### 5.1 TÓPICO 01

#### 5.1.1 Composição da pasta do coproduto do camarão-rosa

A pasta do coproduto apresentou teor de umidade de  $71,90 \pm 1,29$  %, de cinzas de  $4,31 \pm 0,52$  % e proteínas de  $15,92 \pm 1,19$  %. Esses valores são semelhantes aos relatados anteriormente na literatura para camarão (BABU; CHAKRABARTIB; SAMBASIVARAO, 2008; BRASILEIRO et al., 2012). O teor de lipídios de  $4,43 \pm 0,19$  % mostrou que o coproduto do camarão-rosa, capturado no Brasil, é rico neste componente e está de acordo com os valores relatados na

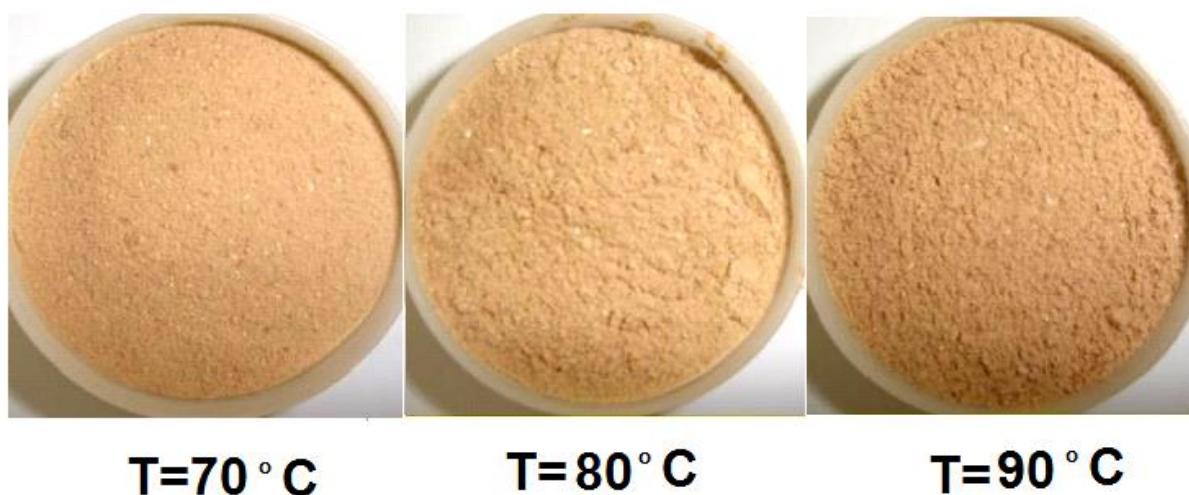
literatura (IBRAHIM et al., 1999; SÁNCHEZ- CAMARGO et al., 2011) uma vez que o depósito de gordura está localizado no hepato-pâncreas, que fica na região do cefalotórax. O rendimento de carotenoides do coproduto fresco foi de  $38,91 \pm 1,18$   $\mu\text{g/g}$  de pasta. Os resultados da composição realizada para a caracterização do coproduto do camarão-rosa, após a secagem em leito de jorro em diferentes temperaturas, estão listados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Composição do coproduto obtido após secagem em leito de jorro

Temperatura (°C)	Umidade (%)	Proteína (%)	Lipídio (%)	Cinza (%)	D <sub>Ps</sub> ( $\mu\text{m}$ )
70	$10,85 \pm 1,02$	$51,66 \pm 1,00$	$7,48 \pm 0,20$	$21,48 \pm 0,87$	$124 \pm 6,0$
80	$9,51 \pm 0,82$	$54,84 \pm 0,54$	$7,78 \pm 0,63$	$21,31 \pm 0,90$	$155 \pm 10,0$
90	$8,70 \pm 0,54$	$54,43 \pm 0,62$	$7,92 \pm 0,78$	$20,06 \pm 1,20$	$186 \pm 8,0$

Os resultados acima mostram que o teor de umidade do pó obtido diminuiu de 10,85 para 8,70 %, em base úmida (bu), com o aumento da temperatura do ar de admissão de 70 para 90 °C. Esses valores foram inferiores aos relatados por Niamnuy et al. (2008), que obtiveram entre 15 – 16 % (bu) na secagem de camarão branco (*Penaeus indicus*) em secador de leito de jorro. Devahastin et al. (2006), investigando o comportamento hidrodinâmico de um leito fluidizado tipo leito de jorro na secagem de camarão branco (*Penaeus indicus*), relataram que o camarão deve ser seco até um teor de umidade em torno de 20 % (bu) para garantir a sua estabilidade. Nesse sentido, estudos enfatizam a influência desse parâmetro na eficiência de extração de compostos bioativos (OBENG et al., 2010; WIJNGAARD et al., 2012; AZMIR et al., 2013). Em geral, quanto maior o teor de umidade, menor o rendimento de extração de compostos bioativos lipofílicos como o caroteno (WIJNGAARD et al., 2012). Isso pode ser explicado pelo fato de que a água pode atuar como barreira à difusão desse tipo de composto bioativo para fora da matriz diminuindo a eficiência de extração. Observou-se também que os valores de umidade dos pós obtidos neste trabalho, ao comparar com o teor de umidade comercial (em torno de 10 %, bu), apresentaram boas condições de conservação e armazenamento.

Em relação aos teores de lipídio, proteína e cinza (Tabela 5), os resultados, por meio da ANOVA fator único, mostram que não houve variações significativas ( $p > 0,05$ ) com as temperaturas de secagem selecionadas neste estudo. Cabe também destacar que em comparação com os dados encontrados na literatura, o coproduto de camarão em pó obtido neste estudo se apresenta como uma boa fonte de proteína (GUERARD et al., 2007; BABU; CHAKRABARTIB; SAMBASIVARAO, 2008; SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2011). Na Figura 16 encontram-se imagens do coproduto do camarão secos em leito de jorro nas diferentes temperaturas.

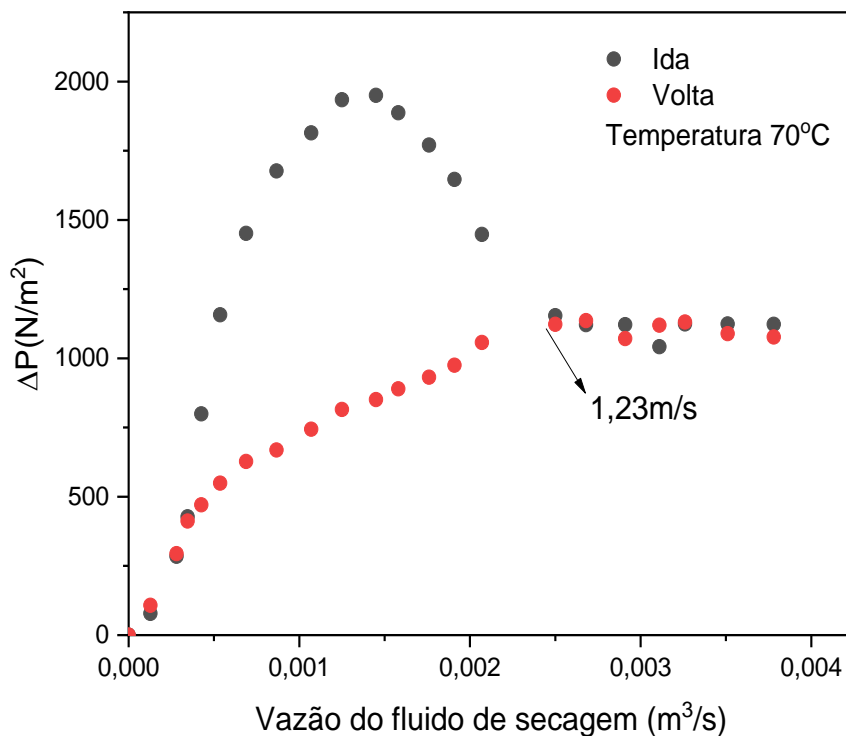


**Figura 16.** Fotos do coproduto de camarão seco em leito de jorro nas diferentes temperaturas

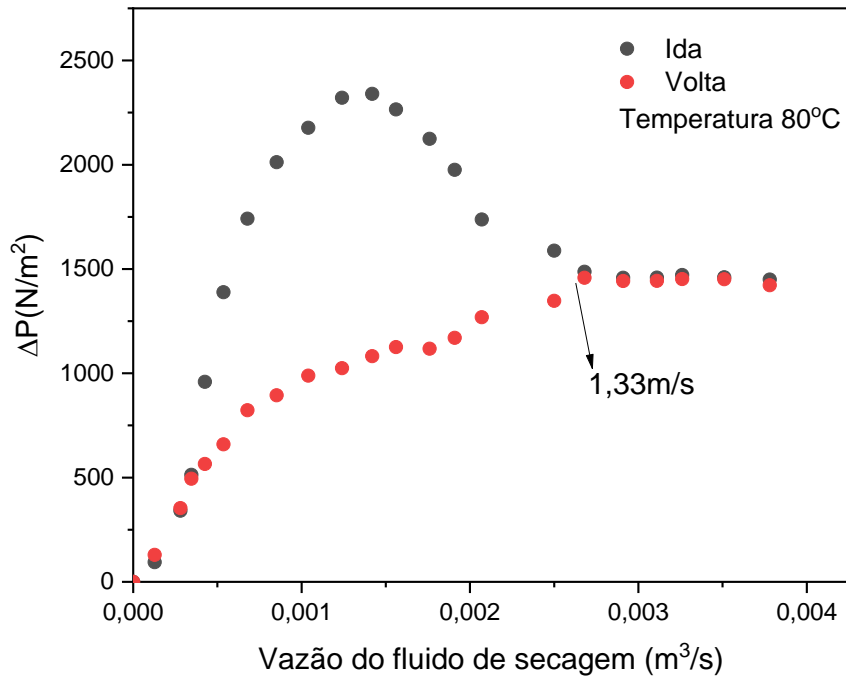
Outro aspecto a ser destacado na secagem da pasta do coproduto em leito de jorro está relacionado ao tamanho das partículas do produto em pó ( $D_{Ps}$ ), em que o aumento da temperatura causou também um aumento no diâmetro médio das partículas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5). Esse comportamento pode ser explicado devido o tempo de residência da pasta dentro do secador, que foi maior na temperatura de 70 °C, fazendo com que essa amostra sofresse mais fricção decorrente das colisões entre as partículas inertes e as paredes do secador. Comportamento semelhante foi obtido por Dotto et al. (2011) na produção experimental de pó de quitosana em leito de jorro e, nesse caso, o aumento da temperatura de 90 °C para 110 °C causou um aumento no tamanho das partículas de 100 para 200  $\mu\text{m}$ . A quitosana é um componente importante do coproduto do camarão e as suas características de

ligação e aglomeração quando submetidas a tratamento térmico podem ter influência também no tamanho das partículas dos produtos. Estudos enfatizam a influência do diâmetro médio na eficiência de extração de compostos bioativos, como Sun e Temelli (2006), cujo rendimento total de carotenoides aumentou de 1110 para 1370 e 1504  $\mu\text{g/g}$  de cenoura seca com tamanhos de partícula de 1,0 – 2,0 mm para 0,5 – 1,0 mm e 0,3 – 0,5 mm, respectivamente. Reduzir o tamanho das partículas aumenta a relação superfície por volume da amostra e, conseqüentemente, aumenta o contato entre a fase sólida e a fase fluida.

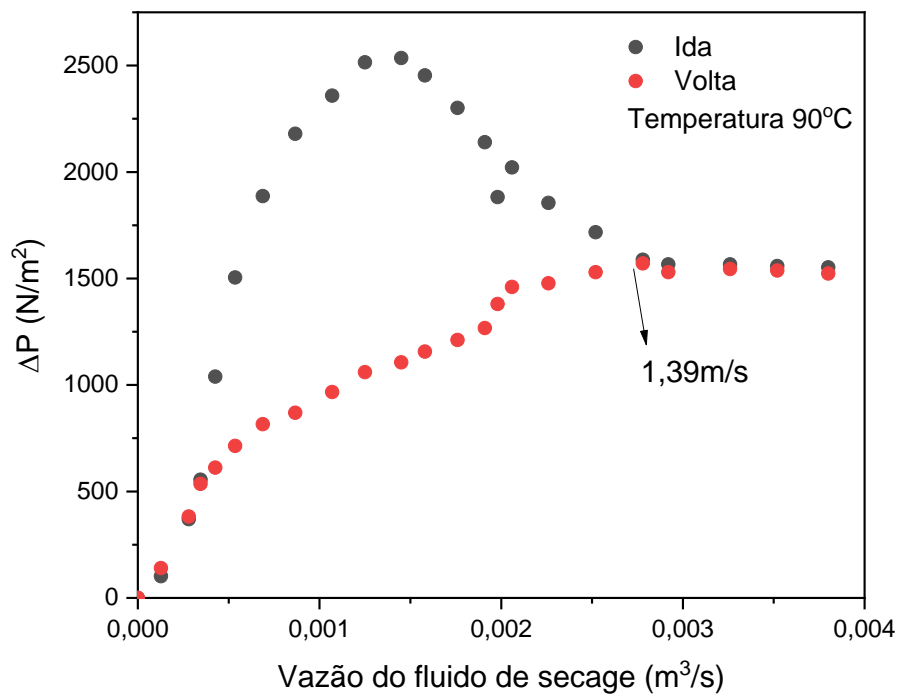
Por meio de curvas de velocidade versus queda de pressão (Figuras 17, 18 e 19) foram determinadas as velocidades de secagem do ar utilizadas nos experimentos para garantir a estabilidade do jorro. Neste experimento utilizamos água destilada ao invés da pasta de coproduto.



**Figura 17.** Curvas da fluidodinâmica do leito de jorro na temperatura de 70 °C

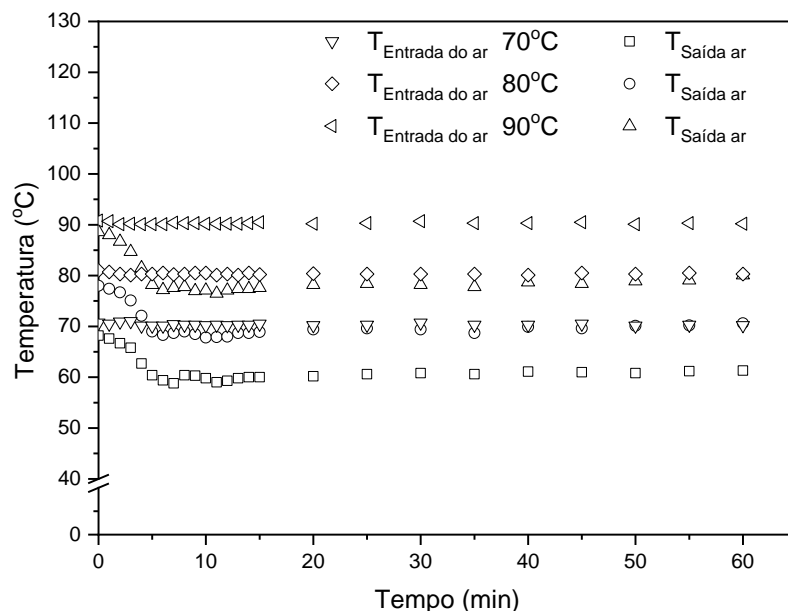


**Figura 18.** Curvas da fluidodinâmica do leito de jorro na temperatura de  $80^\circ C$



**Figura 19.** Curvas da fluidodinâmica do leito de jorro na temperatura de  $90^\circ C$

Na Figura 20 podemos verificar as mudanças causadas na temperatura do ar de saída do sistema de secagem pela alimentação da pasta do coproduto de camarão-rosa em relação ao leite seco. Todos os resultados mostram uma queda repentina na temperatura do ar de saída no momento em que a pasta foi adicionada. A diminuição pode ser explicada pela energia gasta para vaporizar os filmes líquidos formados nas superfícies das partículas inertes por adesão da pasta; isso, por sua vez, faz com que a temperatura das partículas também diminua à medida que experimentam o resfriamento evaporativo. Este comportamento foi mais pronunciado nos primeiros 7 minutos de secagem. A temperatura do ar de saída não é restaurada ao seu valor inicial, mas se estabiliza em um nível mais baixo e permanece quase constante ao longo da secagem. O mesmo efeito foi observado por Dotto et al. (2011), na secagem da quitosana em leite de jorro e Oliveira et al. (2008), na produção de extrato seco de *Spirulina platensis* em leite de jorro. O momento em que a temperatura se estabilizou foi considerado como condição de regime permanente e esse comportamento permaneceu constante até o final da operação de secagem (60 minutos).



**Figura 20.** Temperatura do fluido de saída do leite de jorro

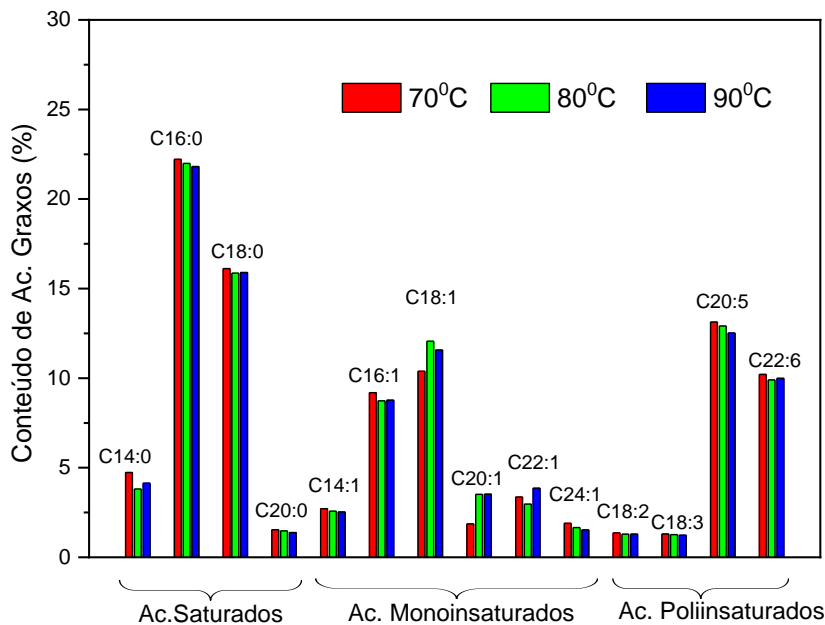
Os tempos de residência dos pós do coproduto de camarão-rosa no interior da câmara de secagem foram 3,1, 2,8 e 2,4 minutos a 70, 80 e 90 °C, respectivamente. Esses valores foram inferiores aos relatados por Tacon e Freitas



(2007), de 12,2 a 17,7 minutos na secagem de pastas em leite de jorro e mais elevados do que os encontrados em secadores por pulverização como o *spray dryer* (KIEVIET; KERKHOF, 1995; CAPARINO et al., 2012). Por outro lado, esses resultados demonstram que a aplicação do leite de jorro pode ter efeitos benéficos na estabilidade de carotenoides e de macromoléculas presentes no coproduto, como proteínas e ácidos graxos, por combinação da temperatura moderada com tempos de secagem reduzidos.

### 5.1.2 Composição de ácidos graxos no coproduto seco em leite de jorro

O conteúdo de ácidos graxos presentes no coproduto de camarão-rosa seco em leite de jorro encontra-se ilustrado na Figura 21, onde quatorze ácidos graxos foram identificados. Não foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na composição de ácidos graxos dos óleos presentes nos coprodutos quando comparados nas diferentes temperaturas de secagem aplicadas.



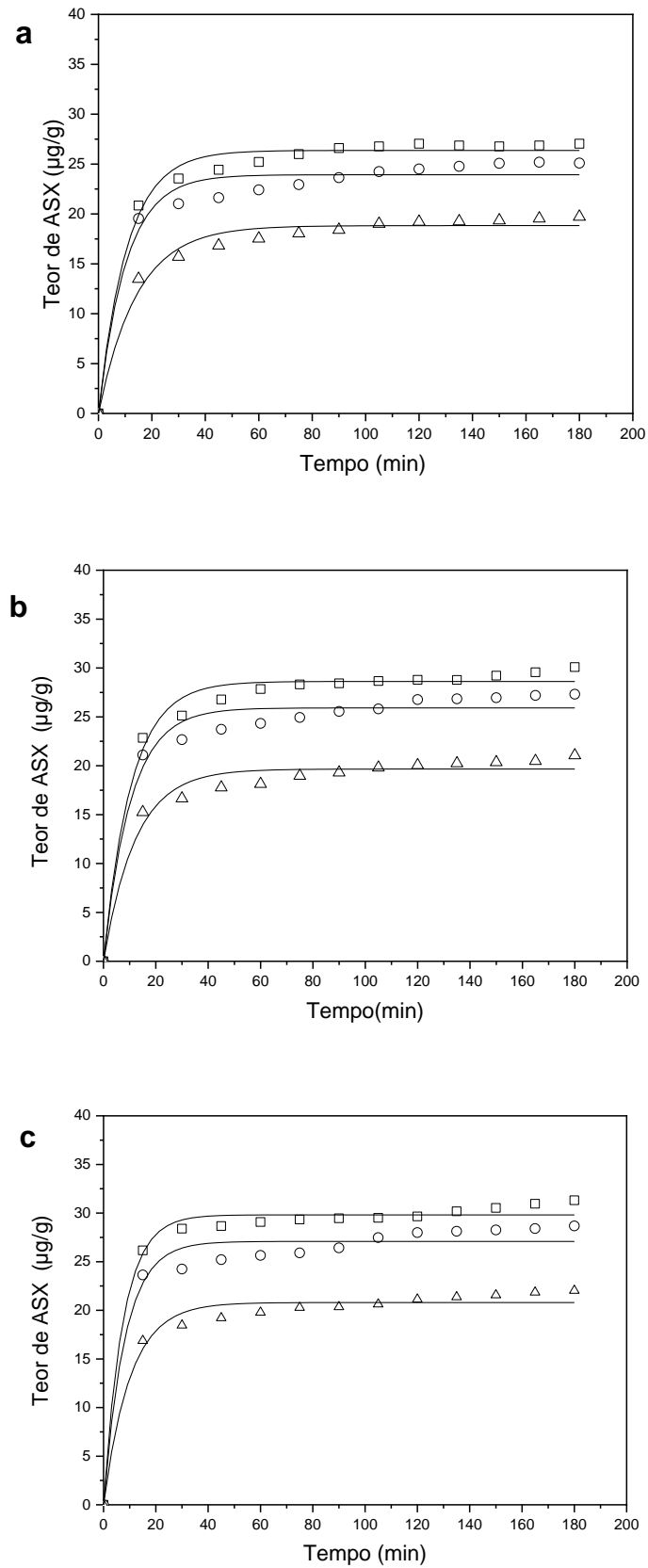
**Figura 21.** Conteúdo de ácidos graxos presentes nos coprodutos de camarão secos em leite de jorro

Cabe destacar que a composição de ácidos graxos encontrada neste estudo foi semelhante à relatada por Sánchez-Camargo et al. (2012). Os resultados

mostram que os percentuais de ácidos graxos saturados e insaturados foram de 43,65 % e 56,35 %, respectivamente. Dos ácidos graxos saturados, os mais comuns foram o ácido palmítico (22,05 %) e o ácido esteárico (15,95 %) e dos ácidos graxos monoinsaturados, os predominantes foram o ácido oleico (11,34 %) e o ácido palmitoleico (8,90 %). Com relação aos ácidos graxos poli-insaturados, os componentes eicosapentaenoicos (EPA) e docosaexaenoicos (DHA), ácidos graxos do grupo  $\omega$ -3, foram os mais representativos com 12,85 % e 10,03 %, respectivamente. Vale salientar que pescados em geral constituem uma fonte importante de ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3, principalmente EPA e DHA. Essas duas categorias de ácidos graxos são essenciais para o desenvolvimento e funcionamento de determinados órgãos e para diversas respostas bioquímicas e fisiológicas do organismo e não podem ser sintetizados pelo homem, devendo ser obtidos a partir da dieta. Assim, os lipídios presentes no coproduto do camarão-rosa e obtidos na secagem em leite de jorro constituem uma importante fonte de ácidos graxos  $\omega$ -3, que oferecem benefícios à saúde humana e podem servir também para enriquecer rações animais.

### **5.1.3 Influência da temperatura na cinética de extração de ASX em oleína**

Os efeitos no rendimento da extração da ASX em diferentes temperaturas de extração e secagem são mostrados na Figura 22. Como pode ser visto, o rendimento da ASX diminuiu com o aumento das temperaturas do ar de entrada. Isso pode ser explicado pelo fato de que, como a maioria dos carotenoides, a ASX é uma molécula altamente insaturada e, portanto, é sensível à alta temperatura, luz e condições oxidativas que podem promover a isomerização da sua forma *trans*, configuração habitual na natureza, para a configuração *cis* (GUERIN; HUNTLEY; OLAIZOLA, 2003). O modelo matemático descrito pela Equação 14 mostra um bom ajuste aos dados experimentais, como pode ser visto na Figura 22.



**Figura 22.** Cinética de extração da ASX a 50 °C (a), 60 °C (b), e 70 °C (c) e o modelo de transferência de massa ajustado (–) para as temperaturas de secagem (□) 70 °C; (O) 80 °C e (Δ) 90 °C

As constantes do modelo estão reunidas na Tabela 6, onde os parâmetros  $Y_e$  e  $k_{L,a}$  foram estimados por ajuste não linear dos mínimos quadrados pela aplicação da Equação 14 aos dados cinéticos experimentais obtidos na extração da ASX com oleína de palma. Pode-se observar que o rendimento de ASX em equilíbrio por massa de coproduto ( $Y_e$ ) aumenta com o aumento da temperatura de extração e diminui com o aumento da temperatura do ar de admissão no leito de jorro. A influência da temperatura de secagem e da temperatura de extração nos parâmetros  $Y_e$  e  $k_{L,a}$  foi analisada estatisticamente por meio do teste ANOVA fator único, que revelou significativa influência de ambas as temperaturas ( $p < 0,05$ ) nesses parâmetros. O aumento no rendimento da extração pode ser atribuído à clivagem do complexo caroteno-proteico por tratamento térmico, que resultou no aumento da captação de pigmentos pelo meio de extração. Cabe mencionar que a umidade do coproduto em pó também pode ter influenciado nesse aspecto. Sachindra e Mahendrakar (2005) obtiveram rendimento máximo de carotenoides a partir de coproduto de camarão usando óleo de girassol como solvente numa proporção de 2:1 de óleo para coproduto e aquecimento a uma temperatura de 70 °C. Os autores observaram que o aumento da temperatura de extração acima de 70 °C resultou na diminuição do rendimento de carotenoides.

O valor do parâmetro  $k_{L,a}$  aumenta com o aumento da temperatura de extração e permanece aproximadamente constante com o aumento da temperatura do ar de admissão no leito de jorro (Tabela 6). Isso pode ser explicado pelo fato de que a difusividade mássica é afetada pela temperatura. À medida que a temperatura aumenta, o coeficiente de difusividade também aumenta, levando ao aumento da taxa de transferência de massa da ASX do sólido (coproduto em pó) para a fase líquida do sistema, a oleína de palma. O modelo apresentou valores consistentemente elevados de coeficiente de determinação ( $R^2$ ), na faixa de 0,9685 - 0,9912. Isso indica que o modelo pode descrever satisfatoriamente a extração de ASX em diferentes condições de temperatura.

**Tabela 6.** Parâmetros  $Y_e$  e  $k_{L.a}$  nas várias temperaturas dos processos de secagem e de extração, calculados usando o modelo cinético de transferência de massa

Extração	Secagem											
	70 °C				80 °C				90 °C			
	T (°C)	$Y_e P^*$ ( $\mu\text{g/ g}$ )	$Y_e E^{**}$ ( $\mu\text{g/ g}$ )	$k_{L.a}$ (1/min.)	$R^2$	$Y_e P^*$ ( $\mu\text{g/ g}$ )	$Y_e E^{**}$ ( $\mu\text{g/ g}$ )	$k_{L.a}$ (1/min.)	$R^2$	$Y_e P^*$ ( $\mu\text{g/ g}$ )	$Y_e E^{**}$ ( $\mu\text{g/ g}$ )	$k_{L.a}$ (1/min.)
50	26,375	27,635	0,0936	0,9878	23,941	25,098	0,0949	0,9702	18,829	19,722	0,0700	0,9785
60	28,623	30,087	0,0944	0,9860	25,914	27,314	0,0968	0,9716	19,662	21,064	0,0824	0,9685
70	29,814	31,308	0,1347	0,9912	27,084	28,672	0,1228	0,9708	20,801	22,035	0,0983	0,9776

\* $Y_e P$  (parâmetro predito); \*\* $Y_e E$  (parâmetro experimental).

#### 5.1.4 Conclusão do tópico 01

A secagem do cefalotórax do camarão-rosa em leito de jorro com partículas inertes mostrou-se uma boa alternativa de aproveitamento desse coproduto. O pó obtido apresentou umidade final em torno de 8,70 – 10,85 % (bu) e elevado teor de ácidos graxos EPA e DHA, além disso, foi observado que o rendimento de ASX foi influenciado pela variação da temperatura de secagem do ar de entrada e da temperatura de extração com oleína de palma, em que a maior concentração foi obtida na secagem a 70 °C e extração também a 70 °C (31,308  $\mu\text{g/ g}$ ). Os dados experimentais apresentaram um bom ajuste ao modelo teórico, com  $R^2$  entre 0,9685 e 0,9912, indicando que este descreve satisfatoriamente a extração de ASX nas temperaturas propostas.

## 5.2 TOPICO 02

Neste tópico são apresentados os resultados relacionados aos estudos do pré-tratamento térmico de cocção do coproduto e da seleção do sistema ultrassom (ultrassom de banho ou de ponteira) a ser utilizado na extração definitiva de ASX, associada a hidrólise enzimática.

### 5.2.1 Composição da pasta do coproduto do camarão-rosa

A composição do coproduto obtido sem tratamento térmico (amostra CSTT) apresentou teor de umidade de  $72,89 \pm 1,21$  %, lipídios de  $4,22 \pm 0,32$  %, cinzas de  $4,25 \pm 0,11$  % e proteínas de  $12,51 \pm 1,84$  % (Tabela 7). Esses valores não apresentaram variações significativas ( $p > 0,05$ ) quando comparados aos valores relatados anteriormente no Tópico 01, o que demonstra que o processo de acondicionamento e armazenagem do coproduto aplicados neste estudo não provocaram a alteração da composição centesimal. Em relação ao coproduto tratado termicamente (amostra CCTT), verificou-se uma influência da cocção sobre a umidade, promovendo uma redução de 72,89 para 69,25 %. Esse comportamento pode ser explicado pela transferência de massa da matriz sólida (coproduto) para o meio externo quando submetida ao processo térmico. Cabe mencionar que no processo de cocção, a transferência de calor ocorreu predominantemente por convecção natural e isso foi suficiente para renovar a camada da interface amostra/meio externo, favorecendo o gradiente de transferência de massa.

**Tabela 7.** Composição do coproduto do camarão-rosa

Composição (%)	CSTT	CCTT
Umidade	$72,89 \pm 1,21$	$69,25 \pm 0,83$
Proteína	$12,51 \pm 1,84$	$14,89 \pm 1,31$
Lipídios	$4,22 \pm 0,32$	$5,09 \pm 1,08$
Cinzas	$4,25 \pm 0,11$	$6,16 \pm 1,23$

CSTT= coproduto sem tratamento térmico; CCTT = coproduto com tratamento térmico.

Um outro efeito a ser destacado e associado a essa transferência de massa no processo de cocção foi que, o mesmo promoveu a concentração dos outros nutrientes quantificados neste estudo.

### 5.2.2 Extração da ASX do coproduto pelo método convencional

Nesta ação do estudo, conforme foi estabelecido na metodologia apresentada anteriormente, a quantificação da disponibilidade do carotenoide ASX nas amostras do coproduto (CCTT e CSTT), foi efetuada pela aplicação da extração convencional usando solventes orgânicos. A amostra CCTT foi a que apresentou a maior disponibilidade de ASX, com  $57,08 \pm 1,60 \mu\text{g/ g}$ , enquanto a amostra CSTT, a disponibilidade de ASX foi de  $39,42 \pm 1,17 \mu\text{g/ g}$ . A análise estatística por meio da ANOVA fator único constatou a existência de uma variação significativa ( $p < 0,05$ ) entre esses resultados. Essa diferença pode ser associada ao fato de que o tratamento térmico provocou a desnaturação da fração proteica do coproduto e, portanto, uma maior liberação da ASX dos complexos caroteno-proteína e caroteno-lipoproteína ocorreu (HERNÁNDEZ BECERRA et al., 2014). Nesse sentido, uma maior quantidade de ASX ficou disponível para ser extraída pelos solventes, fazendo com que a amostra CCTT apresentasse a maior concentração deste biocomposto.

Cabe destacar que os valores de recuperação de ASX obtidos neste estudo são compatíveis com os dados reportados na literatura. Mezzomo et al. (2011) obtiveram  $34,2 \mu\text{g/ g}$  de ASX a partir de coproduto de camarão-rosa cozidos e submetidos à extração por maceração com os mesmos solventes utilizados no presente estudo (éter de petróleo: acetona: água, 15:75:10, v/v/v). Parjikolaei et al. (2015) encontraram  $41,1 \mu\text{g/ g}$  de ASX em coproduto do camarão *Pandalus borealis* utilizando como solvente hexano e isopropanol (60:40, v/v) e extração também por maceração.

É importante destacar que há outros benefícios importantes do processo de cocção, tais como: inativação de enzimas endógenas e melhoria das propriedades física, sensorial e microbiológica da amostra (NIAMNUY; KERDPIBOON; DEVAHASTIN, 2012).

Dessa forma, o protocolo aplicado na obtenção das amostras CCTT, por apresentar melhor resultado na recuperação do carotenoide ASX a partir do

coproduto do camarão-rosa, foi selecionado para dar continuidade aos experimentos.

### 5.2.3 Extração assistida por enzima e ultrassom

A amostra CCTT, nos ensaios de extração de ASX pelo método convencional, apresentou  $57,08 \pm 1,60 \mu\text{g/g}$  deste biocomposto. Cabe destacar que esse valor de ASX foi usado como referência para avaliar a eficiência dos protocolos que foram aplicados na sequência. Na Tabela 8 são apresentados os conteúdos de ASX e os valores de eficiência de recuperação ( $\eta$ ) deste pigmento nos extratos oleosos obtidos através do método combinado de extração assistida por enzima e ultrassom.

**Tabela 8.** Conteúdo de ASX e eficiência de recuperação ( $\eta$ ) nos extratos obtidos com oleína de palma (teste preliminar)

Ensaio	Parâmetros		Ultrassom tipo banho		Ultrassom tipo ponteira	
	T* (min.)	C** (%)	Astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ )	$\eta$ *** (%)	Astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ )	$\eta$ (%)
1	60	0,2	$11,33 \pm 1,44$	$19,85 \pm 2,53$	$23,38 \pm 1,56$	$40,96 \pm 2,73$
2	90	0,2	$13,29 \pm 0,94$	$23,28 \pm 1,64$	$25,81 \pm 1,25$	$45,21 \pm 2,19$
3	60	0,4	$20,21 \pm 0,90$	$35,40 \pm 1,57$	$32,68 \pm 1,92$	$57,25 \pm 3,37$
4	90	0,4	$21,34 \pm 1,48$	$37,38 \pm 2,60$	$36,32 \pm 1,77$	$63,62 \pm 3,10$
5	60	0,6	$23,82 \pm 0,86$	$41,73 \pm 1,50$	$39,37 \pm 0,99$	$68,97 \pm 1,73$
6	90	0,6	$25,56 \pm 1,13$	$44,77 \pm 1,98$	$41,39 \pm 1,14$	$72,51 \pm 2,00$

\*Tempo de hidrólise, \*\*concentração da enzima alcalase, \*\*\*eficiência de recuperação da ASX nos extratos oleosos.

De uma forma geral, a eficiência de recuperação variou na faixa de 19,85 a 72,51 %. Comparando os dados obtidos nesta ação e levando em conta os dois sistemas de sonicação (banho e ponteira), verificou-se estatisticamente por meio da ANOVA fator único, a existência de uma variação significativa ( $p < 0,05$ ) na recuperação de ASX entre os dois sistemas. Os dados da Tabela 8 também mostram que do ponto de vista de processo o sistema tipo banho não apresentou, em nenhum ensaio, eficiência de recuperação de ASX acima de 50 %, o que



inviabiliza a sua aplicação para o caso específico do coproduto do camarão-rosa. Por outro lado, o sistema de sonicação tipo ponteira, com exceção dos ensaios 1 e 2, apresentou eficiência de recuperação acima de 50 %, sendo que o maior valor de recuperação (72,51 %) foi obtido no ensaio 6.

A diferença entre os sistemas de ultrassom pode ser associada ao fato de que, mesmo operando em frequências semelhantes, a intensidade da potência aplicada no sistema banho é atenuada pois as ondas ultrassônicas são transmitidas indiretamente do transdutor do equipamento para a amostra, pois a propagação acontece primeiramente na água contida no banho. Por outro lado, o sistema de ponteira resulta em uma entrega direta da potência aplicada pelo ultrassom no ambiente de extração com uma perda mínima de energia, o que auxilia o rompimento da estrutura interna da matriz sólida e facilita a penetração do solvente nessa estrutura (CHEMAT et al., 2017).

A literatura reporta comportamentos compatíveis com o encontrado neste estudo acerca da utilização do ultrassom de banho e de ponteira. Por exemplo, Horžić et al. (2012) avaliando a eficiência desses dois sistemas na EAU de compostos bioativos da planta *Camellia sinensis* verificaram que um melhor desempenho de extração foi alcançado com o uso do sistema com ponteira. Sukor et al. (2018), avaliando o efeito dos métodos de EAU no teor de ácidos fenólicos presentes na noz-de-galha (*Quercus infectoria*), reportaram também que a eficiência do ultrassom de ponteira foi muito maior do que a do banho ultrassom.

Os ensaios realizados sem a adição da enzima alcalase (ensaios controle) apresentaram  $5,79 \pm 0,48$  e  $6,87 \pm 1,03$   $\mu\text{g}$  de ASX/ g de coproduto para os tempos de 60 e 90 minutos, respectivamente, no sistema tipo banho. Já no sistema de ponteira, os ensaios realizados sem a adição da alcalase apresentaram  $10,15 \pm 0,95$  e  $12,06 \pm 0,89$   $\mu\text{g}$  de ASX/ g de coproduto, também para os tempos de 60 e 90 minutos, respectivamente. Esses resultados mostram que a etapa de hidrólise enzimática foi essencial para se obter valores relevantes de ASX, já que a eficiência de extração sem a aplicação da enzima foi de 10,14 e 12,04 % no sistema banho e 17,78 e 21,13 % no sistema ponteira.

Alguns trabalhos encontrados na literatura observaram resultados semelhantes aos da Tabela 8, por exemplo, Sachindra e Mahendrakar (2005), que utilizaram agitação e aquecimento a 70 °C durante 150 minutos, obtiveram 25,6  $\mu\text{g}$  de ASX/ g de coproduto do camarão *Penaeus indicus* em extratos de óleo de

girassol. Em outro trabalho, Parjikolaei et al. (2015) encontraram 23,0 µg de ASX/ g de coproduto do camarão *Pandalus borealis* utilizando aquecimento a 70 °C e agitação durante 180 minutos e óleo de girassol como solvente. Se estabelecemos uma comparação desses resultados reportados na literatura com os resultados dos ensaios 3, 4, 5 e 6 do sistema ultrassom de ponteira, verificamos que os valores de recuperação de ASX da presente pesquisa são superiores (Tabela 8). Nesse sentido, cabe também destacar o possível efeito sinérgico entre as extrações assistidas por enzima e ultrassom.

Constatamos também, por meio do teste estatístico ANOVA fator único, que o intervalo do parâmetro tempo de hidrólise (60 a 90 minutos) aplicado no tratamento enzimático ao qual as amostras foram submetidas, não proporcionou variações significativas em seus valores de eficiência de recuperação de ASX ( $p > 0,05$ ) quando mantida fixa a concentração da enzima (0,2, 0,4 ou 0,6 %), ou seja, a faixa de tempo estabelecida nessa ação não propiciou condições significativas para que a enzima utilizada atuasse de forma efetiva na desconstrução da estrutura da amostra.

Outra hipótese é a de que o menor tempo utilizado, de 60 minutos, foi suficiente para que a hidrólise enzimática da amostra tenha sido concluída, entretanto, analisando relatos de estudos reportados na literatura, constatou-se que geralmente esse parâmetro apresenta um efeito positivo e significativo no grau de hidrólise de matrizes de origem animal quando se aplica a enzima alcalase (GBOGOURI et al., 2004; MARTINS et al., 2009; LEE; JEON; BYUN, 2011; NIKHITA; SACHINDRA, 2021), portanto, ensaios com um tempo de reação prolongado devem ser testados.

#### **5.2.4 Conclusão do tópico 02**

Após avaliar os resultados dos testes preliminares, optou-se por definir um único sistema de sonicação (ultrassom de ponteira) visando a recuperação da ASX do coproduto do camarão-rosa, bem como, pela inclusão de um novo intervalo dos parâmetros tempo e concentração de enzima na etapa de hidrólise enzimática. Além disso, optamos por incluir uma nova protease comercial nos experimentos, a flavourzyme, com o intuito de estudar a sua influência sobre a taxa de recuperação da ASX e se há um efeito aditivo das duas enzimas misturadas.

### 5.3 TÓPICO 03

Neste tópico são apresentados os resultados relacionados aos estudos dos ensaios definitivos de extração assistida por enzima (EAE) e extração assistida por ultrassom (EAU), sendo o total de 9 ensaios realizados em duplicata. Nesta nova etapa de hidrólise enzimática, foram ampliados o tempo de reação para 120 minutos e a concentração de enzima para 0,8 %, além da inclusão de mais uma protease comercial, a flavourzyme.

#### **5.3.1 Extração assistida por enzima combinada com extração assistida por ultrassom**

Nesta ação continuamos a usar a amostra CCTT (coproduto com tratamento térmico) para ser utilizada nos ensaios de hidrólise e de extração com oleína de palma, empregando o sistema ultrassom de ponteira. Essa amostra nos ensaios de recuperação de ASX pelo método convencional de extração apresentou  $44,96 \pm 1,50 \mu\text{g/g}$  de coproduto. É importante destacar que no tópico 02, o conteúdo de ASX recuperado pelo método convencional foi de  $57,08 \pm 1,60 \mu\text{g/g}$  de coproduto, ou seja, houve um decréscimo de 21,23 %. Associamos essa redução significativa ( $p < 0,05$ ) ao tempo de armazenamento (8 meses de estocagem). Rodriguez-Amaya et al. (2008) relata a influência do armazenamento sob congelamento na estabilidade e na concentração dos carotenoides, em diferentes matrizes alimentícias. De maneira geral, Rodriguez-Amaya et al. (2008) reporta que a estocagem dessas matrizes sob temperatura controlada gera uma perda inicial dos carotenoides e depois, há uma tendência à estabilização. Calvo-Brenes e O'Hare (2020) avaliando o efeito do congelamento e armazenamento sobre o teor de carotenoides presente em uma matriz vegetal encontraram reduções na faixa de 29 a 59 %. Essas informações demonstram que o fator tempo de armazenagem deste coproduto deve ser objeto de futuros estudos.

Com base nas informações citadas acima, neste tópico, o valor de  $44,96 \pm 1,50 \mu\text{g}$  de ASX/g de coproduto foi adotado como referência para avaliar a eficiência dos protocolos que foram aplicados na sequência. Nas Tabelas 9 e 10 são

apresentados os conteúdos de ASX e os valores de eficiência de recuperação ( $\eta$ ) desse composto nos extratos oleosos.

**Tabela 9.** Conteúdo de ASX nos extratos oleosos obtidos por EAE e EAU

Ensaio	Tempo de hidrólise (min.)	Concentração de enzima (%)	Astaxantina ( $\mu\text{g/ g}$ de coproduto hidrolisado)		
			Alcalase	Flavourzyme	Mistura*
1	60	0,4	21,91 $\pm$ 1,28	13,85 $\pm$ 1,06	16,54 $\pm$ 0,17
2		0,6	22,77 $\pm$ 0,92	16,31 $\pm$ 1,15	16,74 $\pm$ 0,74
3		0,8	23,99 $\pm$ 0,69	16,66 $\pm$ 0,59	18,57 $\pm$ 1,03
4	90	0,4	25,29 $\pm$ 0,52	20,67 $\pm$ 1,80	22,10 $\pm$ 0,97
5		0,6	28,05 $\pm$ 0,81	23,53 $\pm$ 1,21	24,35 $\pm$ 0,61
6		0,8	28,51 $\pm$ 1,98	24,63 $\pm$ 0,82	24,20 $\pm$ 0,90
7	120	0,4	28,99 $\pm$ 1,19	25,91 $\pm$ 2,06	27,08 $\pm$ 0,85
8		0,6	29,92 $\pm$ 0,81	27,12 $\pm$ 0,99	27,24 $\pm$ 1,10
9		0,8	31,27 $\pm$ 1,11	27,61 $\pm$ 1,97	28,73 $\pm$ 1,24

\*mistura 1:1 (v/v) das enzimas alcalase e flavourzyme.

Nesta etapa do estudo, os valores obtidos de ASX variaram entre 13,85 a 31,27  $\mu\text{g/ g}$  de coproduto. Verificou-se por meio do teste estatístico ANOVA fator único a existência de efeito significativo e positivo ( $p < 0,05$ ) da variação da concentração nos ensaios efetuados com as enzimas alcalase, flavourzyme e a mistura de ambas (1:1, v/v) sobre o conteúdo de ASX, quando se mantem o tempo fixo (60, 90 ou 120 minutos). O mesmo comportamento é observado quando se mantem fixa a concentração (0,4, 0,6 ou 0,8 %) e varia-se o parâmetro tempo. Cabe destacar, em relação a essa última observação, que os dados obtidos no tópico 02 (Tabela 8) não indicavam uma significância do parâmetro tempo, mas como foi mencionado anteriormente, estudos reportados na literatura afirmam que geralmente esse parâmetro apresenta um efeito positivo e significativo no grau de hidrólise de matrizes de origem animal quando aplicada a enzima alcalase. Nesta etapa do

trabalho, a significância do parâmetro tempo foi constatada não somente para a enzima alcalase como também para a flavourzyme e para a mistura das enzimas.

Os ensaios realizados sem a adição de enzima (ensaios controle) apresentaram  $8,63 \pm 0,94$ ,  $10,23 \pm 1,36$  e  $11,08 \pm 1,12$   $\mu\text{g/g}$  de ASX nos tempos de 60, 90 e 120 minutos, respectivamente, deixando claro que o processo de hidrólise enzimática foi fundamental para a obtenção de resultados satisfatórios de ASX. Esses resultados indicam também que, possivelmente, grande parte da ASX estava presente na forma do complexo caroteno-proteína e/ou caroteno-lipoproteína, e, portanto, foi necessária uma operação, como a hidrólise enzimática, para quebrar esse complexo antes de extrair o carotenoide com sucesso.

**Tabela 10.** Eficiência de recuperação ( $\eta$ ) da ASX nos extratos oleosos obtidos por EAE e EAU

Ensaio	Tempo de hidrólise (min.)	Concentração de enzima (%)	$\eta$ (%)		
			Alcalase	Flavourzyme	Mistura*
1		0,4	$48,73 \pm 2,85$	$30,80 \pm 2,36$	$36,79 \pm 0,38$
2	60	0,6	$50,64 \pm 2,05$	$36,28 \pm 2,56$	$37,23 \pm 1,64$
3		0,8	$53,36 \pm 1,53$	$37,05 \pm 1,31$	$41,30 \pm 2,29$
4		0,4	$56,25 \pm 1,16$	$45,97 \pm 1,77$	$49,15 \pm 2,16$
5	90	0,6	$62,39 \pm 1,80$	$52,33 \pm 2,69$	$54,16 \pm 1,36$
6		0,8	$63,41 \pm 2,18$	$54,78 \pm 1,82$	$53,83 \pm 2,00$
7		0,4	$64,47 \pm 2,65$	$57,63 \pm 2,36$	$60,23 \pm 1,89$
8	120	0,6	$66,54 \pm 1,80$	$60,32 \pm 2,20$	$60,59 \pm 2,45$
9		0,8	$69,55 \pm 2,47$	$61,41 \pm 2,22$	$63,90 \pm 2,76$

\*mistura 1:1 (v/v) das enzimas alcalase e flavourzyme.

Quando avaliamos a eficiência das duas enzimas na recuperação do composto ASX, verificamos o melhor desempenho da enzima alcalase. Com exceção do ensaio 1, em que o tempo de hidrólise é de 60 min. e a concentração de enzima é de 0,4 %, todos os outros ensaios apresentaram  $\eta > 50$  %. Cabe destacar

que a alcalase e a flavourzyme são enzimas com mecanismos de hidrólise distintos, pois a primeira é uma serino-endopeptidase e a segunda é composta por uma mistura de exopeptidases (WEI et al., 2018). As endopeptidases clivam ligações peptídicas dentro da cadeia polipeptídica e as exopeptidases clivam ligações peptídicas nos terminais N ou C (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008). Portanto, possuem conformação do sítio ativo e especificidades enzima-substrato distintas, o que leva a diferentes quantidades de ASX liberada dos complexos caroteno-proteína e caroteno-lipoproteína.

A mistura entre alcalase e flavourzyme foi testada com o intuito de verificar se o uso combinado dessas proteases apresentaria um efeito positivo na recuperação de ASX. A ideia é de que se fosse ampliada a especificidade através da ação das duas enzimas simultaneamente, no mesmo substrato, poderia então aumentar o número de clivagem nas proteínas num tempo reduzido. Entretanto, foi verificado que a mistura não se mostrou eficiente na liberação do biocomposto ASX nos tempos de hidrólise inferiores a 120 minutos (Tabela 10), sugerindo que não houve um efeito sinérgico entre as duas enzimas utilizadas neste estudo.

Foi observado o aumento na recuperação de ASX com o aumento da concentração de enzima e do tempo de hidrólise (Tabela 10), e esse comportamento é válido para as duas enzimas utilizadas, assim como para a mistura destas ( $p < 0,05$ ). Segundo Birkeland e Bjerkeng (2004), esse aumento na recuperação de ASX ocorre devido à maior desestabilização das ligações não-covalentes entre proteína e carotenoides. Como resultado, os carotenoides associados às proteínas que foram hidrolisadas estarão mais acessíveis para serem extraídas pelo solvente (SACHINDRA; MAHENDRAKAR, 2011; SENPHAN; BENJAKUL, 2012).

### **5.3.1 Conclusão do tópico 03**

Neste tópico foi verificado que o fator tempo de armazenamento do coproduto do camarão-rosa afetou a estabilidade da ASX da amostra, pois foi verificada uma degradação desse biocomposto de aproximadamente 21,23 % num período de 8 meses de congelamento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Foi também verificado que a inclusão de um novo intervalo dos parâmetros tempo de hidrólise e concentração de enzima, na etapa de hidrólise enzimática, propiciou efeito significativo e positivo na

recuperação da ASX do coproduto do camarão-rosa ( $p < 0,05$ ). Ao avaliar a eficiência das duas enzimas utilizadas (alcalase e flavourzyme), verificamos o bom desempenho, principalmente, da alcalase na recuperação do composto ASX. A mistura entre alcalase e flavourzyme foi também testada, porém, esta não se mostrou eficiente na liberação deste biocomposto nos tempos de hidrólise inferiores a 120 minutos, sendo, portanto, uma mistura de enzimas que não gerou resultados melhores do que o uso individual destas, já que a redução do tempo de hidrólise é importante tanto do ponto de vista industrial quanto do rendimento do processo.

## 5.4 TÓPICO 04

Neste tópico são apresentados os resultados das análises efetuadas na oleína de palma e nos extratos oleosos contendo o biocomposto ASX. Os extratos obtidos nas condições do ensaio 5 (concentração de enzima de 0,6 % e 90 minutos de hidrólise) foram selecionados para dar continuidade aos experimentos. Todos os extratos obtidos nas condições do ensaio 5 apresentaram eficiência de recuperação ( $\eta$ ) de ASX acima de 50 % (Tabela 10), além disso, outro critério adotado na seleção do ensaio 5 foi o fato de que neste foram obtidos teores de ASX satisfatoriamente semelhantes quando comparados aos ensaios utilizando 0,8 % de enzima e/ou 120 minutos de incubação (Tabela 9). Esses parâmetros são importantíssimos quando considerado que em larga escala o uso de menos tempo e enzima possível é desejável, já que isso reflete diretamente no custo da produção.

### 5.4.1 Estabilidade oxidativa

Os resultados de estabilidade oxidativa referentes à oleína, ao extrato oleoso obtido no ensaio controle (sem adição de enzima e tempo de incubação de 90 minutos) e ao ensaio 5 para todas as preparações enzimáticas estudadas: alcalase (A), flavourzyme (F) e a mistura 1:1 destas (AF), estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Estabilidade oxidativa da oleína e dos extratos oleosos com o biocomposto ASX

Amostras	Astaxantina ( $\mu\text{g/ g}$ )	TI (h)	Ampliação de TI (%)
Oleína de palma	ND	10,45 $\pm$ 0,16	-
Controle	10,23 $\pm$ 1,36	12,59 $\pm$ 0,30	20,48
Extrato A	28,05 $\pm$ 0,81	29,23 $\pm$ 0,35	179,71
Extrato F	23,53 $\pm$ 1,21	26,89 $\pm$ 0,99	157,32
Extrato AF	24,35 $\pm$ 0,61	27,73 $\pm$ 0,22	165,36

ND = não detectado; TI = Tempo de indução em horas.



A análise de estabilidade oxidativa provoca a aceleração do processo de oxidação natural do óleo e, para isso, a amostra é submetida à exposição constante ao calor e a um elevado fluxo de ar. Durante esse processo, o tempo de exposição é monitorado até que seja detectada uma taxa elevada de oxidação através do aumento da condutividade elétrica da água ultrapura, que é denominado de tempo de indução (TI).

A resistência da oleína de palma às condições extremas desta análise está relacionada, principalmente, com a sua composição em ácidos graxos, que é composta sobretudo por ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1), além de apresentar triacilgliceróis de altos pontos de fusão (ENRÍQUEZ-FERNÁNDEZ et al., 2011). Além disso, na oleína podemos encontrar naturalmente a vitamina E, que assim como a ASX, possui também ação antioxidante (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

A estabilidade oxidativa da amostra controle (sem adição de enzima) foi medida para que fosse possível avaliar a relevância do tratamento enzimático sobre a estabilidade oxidativa dos extratos oleosos obtidos. Essa amostra apresentou TI igual a  $12,59 \pm 0,30$  horas, que foi relativamente próximo do valor obtido para a oleína, de  $10,45 \pm 0,16$  horas (Tabela 11). Ainda que próximos, esses valores apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ ) no teste estatístico ANOVA fator único, portanto, mesmo em baixa concentração, a ASX contida na amostra controle ( $10,23 \mu\text{g/g}$  de coproduto) influenciou positivamente, proporcionando uma ampliação de 20,48 % no valor de TI.

Os resultados da Tabela 11 mostram que a ASX solubilizada na oleína promoveu um aumento da estabilidade oxidativa de todas as amostras, sendo observado um tempo de indução crescente conforme o aumento da concentração de ASX. O melhor resultado foi verificado no ensaio com a enzima alcalase (29,23 h), que proporcionou um acréscimo de 179,23 % no valor de TI, indicando, portanto, que essa amostra foi a mais eficiente no retardo da oxidação da matriz oleosa. Angelo e Jorge (2008) na avaliação da estabilidade oxidativa de óleo de girassol utilizando antioxidantes sintético (palmitato de ascorbila) e natural (extrato de *Coriandrum sativum* L.) encontraram um acréscimo de 59,71 % e 11,21 %, respectivamente, no valor de TI no óleo de girassol sob termoxidação. Cabe mencionar que o palmitato de ascorbila é um antioxidante sintético derivado do éster de ácido ascórbico, com eficiência em retardar a oxidação lipídica. O Ministério da

Saúde, no Brasil, limita o uso do palmitato de ascorbila a 500 mg/ kg como concentração máxima permitida. É importante ressaltar que é comum a utilização de outros antioxidantes sintéticos, tais como o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o butil-hidroxi-anisol (BHA), entretanto, estudos toxicológicos demonstram possíveis efeitos carcinogênicos causados por antioxidantes sintéticos quando consumidos em doses elevadas (BOTTERWECK et al., 2000; LABRADOR et al., 2007; CAROCHO et al., 2015). Dessa forma, há um grande interesse em utilizar antioxidantes que sejam seguros e obtidos de fontes naturais. Entre os antioxidantes naturais, o  $\beta$ -caroteno e o licopeno são os carotenoides mais empregados na indústria de alimentos. Acrescentamos ainda que, estudos reportam que a atividade antioxidante da ASX é de 10 vezes maior do que a do  $\beta$ -caroteno e 100 vezes maior do que a do  $\alpha$ -tocoferol (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2012; AMBATI et al., 2014).

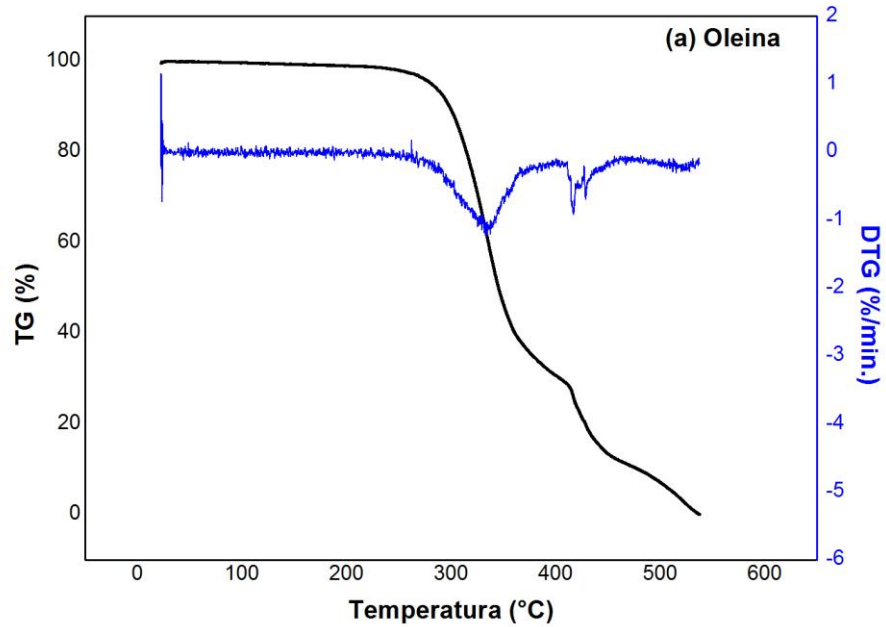
Neste contexto, identificamos que a busca por compostos naturais que substituam ou reduzam a necessidade da utilização de compostos sintéticos é uma tendência e, por isso, o presente estudo tem grande relevância em apresentar como uma alternativa a ASX, que é um composto natural com alto potencial no retardo ou na prevenção da oxidação lipídica, principalmente em processo de fritura, onde a fração lipídica está amplamente exposta às alterações que ocorrem em decorrência da termoxidação.

#### **5.4.2 Análise termogravimétrica**

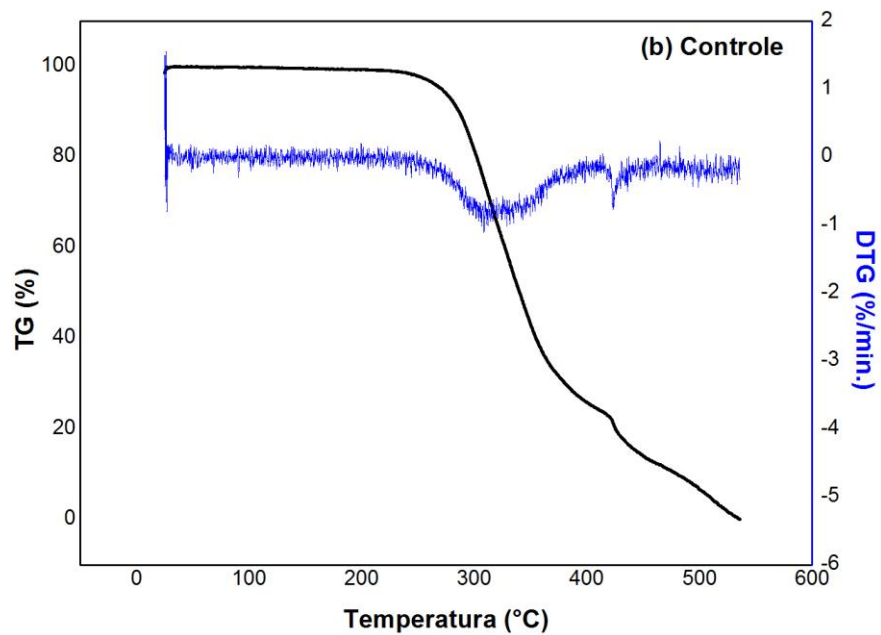
Os resultados da análise termogravimétrica referentes à oleína, ao extrato oleoso obtido no ensaio controle (sem adição de enzima e tempo de incubação de 90 minutos) e ao ensaio 5 para todas as preparações enzimáticas estudadas estão apresentados nas Figuras 23, 24, 25, 26 e 27.

As curvas a seguir mostram a decomposição térmica experimentadas pelas diferentes amostras. Verificou-se que ocorreram três estágios de perda de massa durante o aquecimento da oleína (Figura 23), sendo que o primeiro teve início em 299,95 °C se estendendo até 355,40 °C com uma perda de massa de 68,39 %. O segundo estágio teve início em 412,94 °C com finalização em 431,99 °C e o terceiro iniciou em 498,58 °C se estendendo até 538,88 °C. Segundo Dweck e

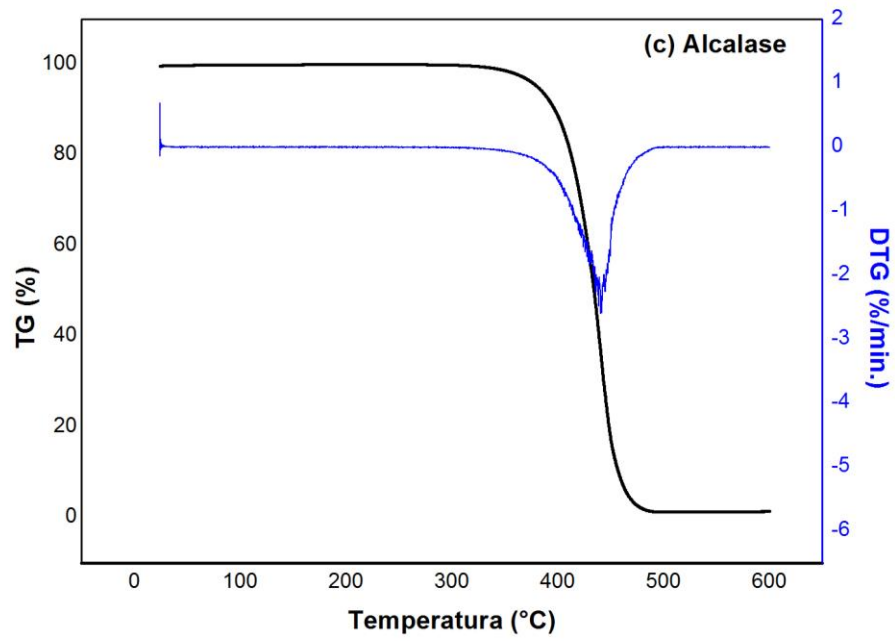
Sampaio (2004), nas temperaturas do primeiro evento ocorre a decomposição dos ácidos graxos insaturados e nos subsequentes, a decomposição dos ácidos graxos saturados.



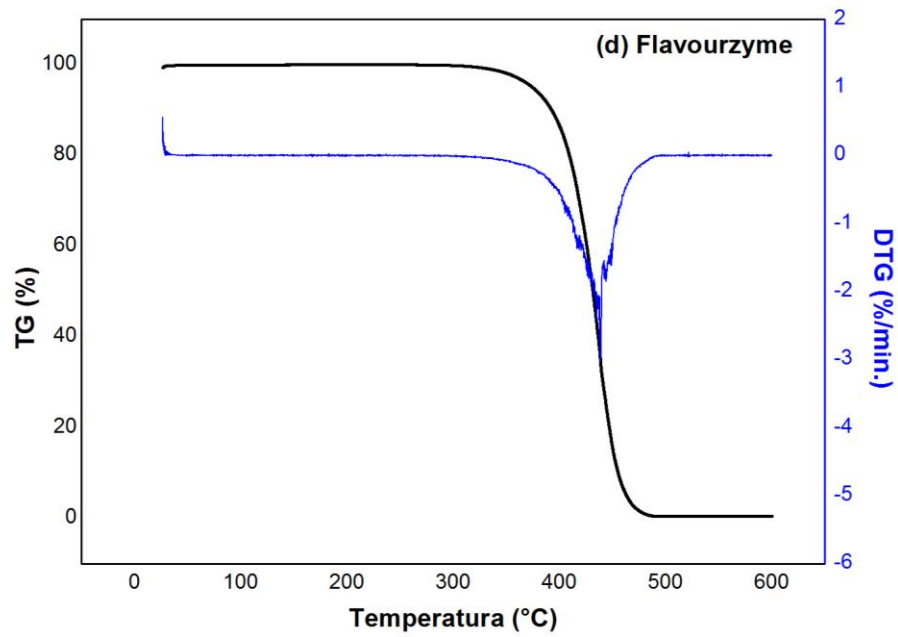
**Figura 23.** Curvas de TG e DTG da oleína de palma



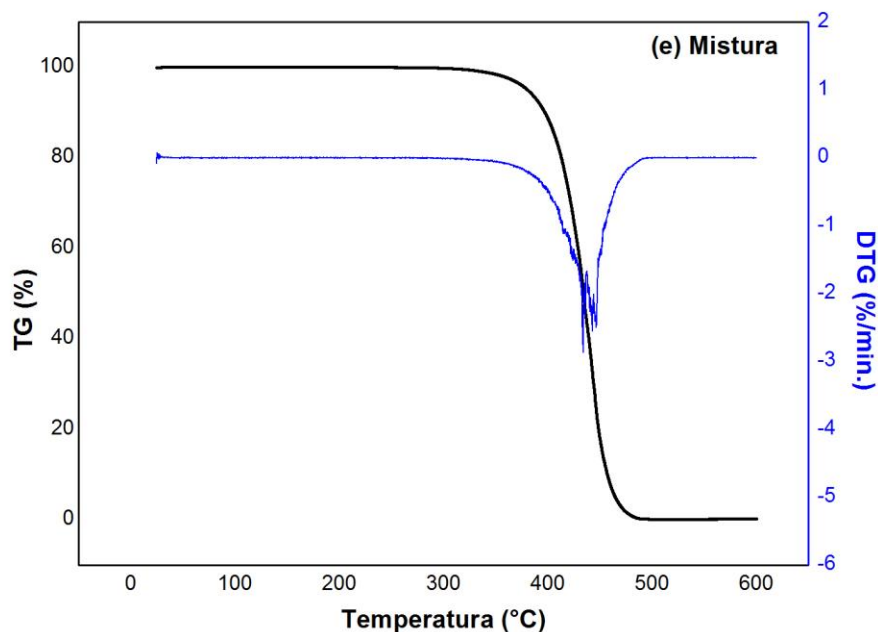
**Figura 24.** Curvas de TG e DTG da amostra controle



**Figura 25.** Curvas de TG e DTG do extrato oleoso obtido com a alcalase



**Figura 26.** Curvas de TG e DTG do extrato oleoso obtido com a flavourzyme



**Figura 27.** Curvas de TG e DTG do extrato oleoso obtido com a mistura alcalase e flavourzyme (1:1, v/v)

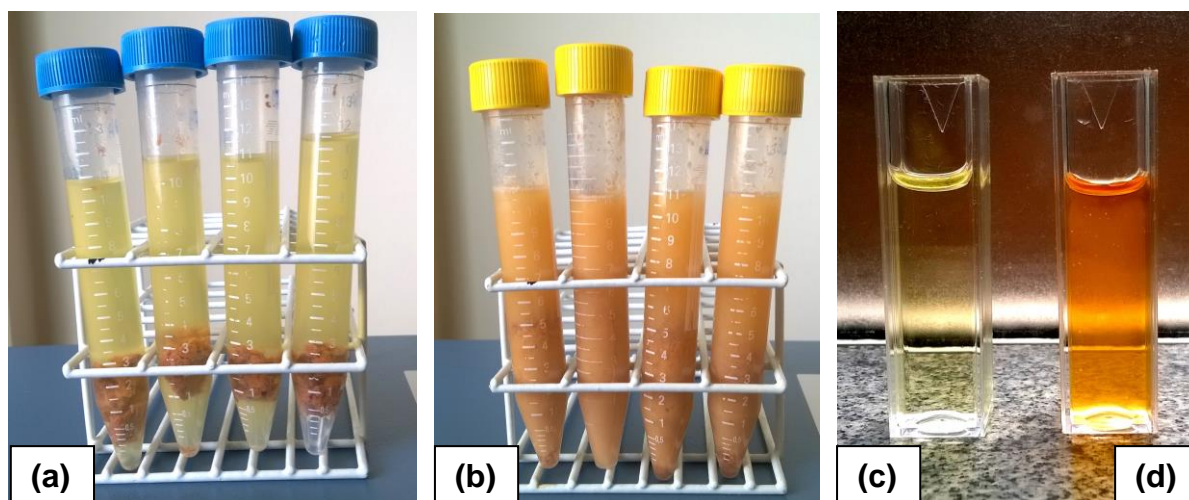
O termograma da amostra controle (Figura 24) também apresentou três eventos de perda de massa, semelhantes com os observados na TG/ DTG da oleína. O evento mais importante ocorreu entre 285,51 e 349,80 °C, com uma perda de massa de 71,85 %. Esse leve descolamento dos eventos de perda de massa da amostra controle em relação à oleína pode ser associado à presença da ASX, ainda que presente em concentração insuficiente para alterar de forma relevante a estabilidade térmica dessa amostra.

A hipótese da influência da ASX sobre as curvas de TG/ DTG se torna mais incisiva quando analisamos o comportamento das amostras obtidas utilizando o tratamento enzimático (Figuras 25, 26 e 27). Essas três curvas apresentaram eventos totalmente diferentes das amostras oleína e controle. Foi observado, para a amostra hidrolisada com alcalase, apenas um evento de perda de massa com início a 415,55 °C e final a 453,69 °C, ou seja, o início da decomposição dos ácidos graxos foi retardado, e com isso a estabilidade térmica da amostra foi aumentada em 130 °C em relação à amostra controle. Os extratos obtidos com flavourzyme e com a mistura das enzimas apresentaram comportamento semelhante à amostra com alcalase, havendo também um único evento de perda de massa em ambas as

amostras entre 416,58 a 451,87 °C, para a flavourzyme, e 414,38 a 454,44 °C, para a mistura. A ASX, numa concentração relevante provocou um retardo na degradação térmica do extrato, que, segundo Hussein (2015), pode ter ocorrido devido à capacidade da ASX de doar os hidrogênios dos anéis de  $\beta$ -ionona aos radicais livres lipídicos, retardando a propagação em cadeia da oxidação. A estrutura de polieno na molécula de ASX também responde por sua atividade antioxidante, pois neutraliza os radicais livres adicionando-os em sua própria ligação dupla (HIGUERA-CIAPARA; FELIX-VALENZUELA; GOYCOOLEA, 2006).

#### 5.4.3 Análise colorimétrica

A cor é um fator importante para o apelo visual, imagem e valor de um produto, além de ser determinante na aceitabilidade do consumidor. Nesse sentido, o extrato oleoso obtido a partir do coproduto do camarão-rosa apresentou coloração alaranjada, que é desejável em inúmeros produtos alimentícios (Figura 28).



**Figura 28.** Coproduto hidrolisado e oleína antes da sonicação (a); coproduto hidrolisado e oleína após sonicação (b); oleína de palma (c); extrato oleoso após centrifugação (d)

Na Tabela 12 são apresentados os resultados de cor da oleína, da amostra controle e dos extratos oleosos obtidos nas condições do ensaio 5, para todas as aplicações enzimáticas.

**Tabela 12.** Dados dos parâmetros de cor da oleína, amostra controle e extratos oleosos enriquecidos com ASX

Parâmetros	Amostras				
	Oleína	Controle <sup>1</sup>	Alcalase	Flavourzyme	Mistura <sup>2</sup>
L*	28,54 ± 1,39	27,27 ± 1,02	21,72 ± 0,06	24,48 ± 1,27	22,37 ± 0,65
a*	-3,76 ± 0,06	1,57 ± 0,20	3,13 ± 0,01	1,87 ± 0,04	1,93 ± 0,02
b*	13,64 ± 0,24	13,53 ± 0,18	15,98 ± 0,04	14,45 ± 0,65	13,32 ± 0,10
ΔE	-	5,44 ± 0,10	9,53 ± 0,73	6,58 ± 0,24	8,04 ± 0,54
C*	14,15 ± 0,24	13,62 ± 0,20	15,92 ± 0,61	14,53 ± 0,72	13,46 ± 0,11
h°	105,40 ± 0,17	85,31 ± 0,83	78,97 ± 0,11	82,85 ± 0,15	81,76 ± 0,01

<sup>1</sup>Amostra sem adição de enzima e tempo de incubação de 90 min.; <sup>2</sup>Mistura 1:1 (v,v) de alcalase e flavourzyme.

O parâmetro L\* é uma medição da luminosidade, que avalia de maneira a estabelecer uma escala cinza, com valores entre preto (0) e branco (100) (PATHARE et al., 2013). O menor valor encontra-se na amostra alcalase (21,72), ao passo que a amostra oleína apresentou o maior valor para este parâmetro (28,02). Essa diferença de luminosidade pode ser explicada devido à inclusão do composto ASX provocada pelo processo de EAE combinado com EAU, resultando numa menor refletância da luz da amostra alcalase. Resultado semelhante foi reportado por Corbu et al. (2019) ao estudarem o enriquecimento de óleos vegetais comestíveis com carotenoides extraídos do coproduto da baga do *Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis*, um arbusto espinhoso comum nas regiões áridas do noroeste da China, e por Nour et al. (2018) avaliando os efeitos dos carotenoides extraídos de coproduto de tomate seco na estabilidade e nas características de vários óleos vegetais.

Os valores de a\* e b\* aumentaram significativamente (p<0,05) com o aumento nos níveis de transferência de ASX ao solvente oleína. Cabe destacar que o parâmetro a\* assume valores positivos para cores avermelhadas, enquanto que b\* toma valores positivos para cores amareladas (PATHARE et al., 2013) e que a sinergia entre esses dois parâmetros proporcionou o desenvolvimento da tonalidade alaranjada dos extratos oleosos (Figura 28), sendo que a maior intensidade de a\* foi encontrada no extrato obtido com EAE efetuada com a enzima alcalase. Cabe destacar que, além dos aspectos nutricionais relacionados ao aumento da

funcionalidade da oleína, o enriquecimento com ASX leva à modificação das características cromáticas dos extratos, que pode melhorar a percepção do consumidor em relação à atratividade do produto.

As diferenças totais de cor ( $\Delta E$ ) entre a oleína e os extratos oleosos (Tabela 12) mostram que a maior diferença foi detectada na amostra hidrolisada com alcalase, de 9,53. Essa constatação está diretamente relacionada com a concentração mais elevada de ASX deste extrato. É importante mencionar ainda, que todos os resultados de diferença de cor total foram estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).

As modificações provocadas por processos e tratamentos sobre a cor do alimento podem ser medidas a partir do índice de diferença total de cor ( $\Delta E$ ) que indica a magnitude desse gradiente entre amostras selecionadas e uma amostra padrão. Para isso, a  $\Delta E$  pode ser avaliada dentro de uma escala com os níveis "muito distinto" ( $\Delta E > 3$ ), "distinto" ( $1,5 < \Delta E < 3$ ) e "levemente distinto" ( $\Delta E < 1,5$ ) (PATHARE et al., 2013). Quanto maior o valor de  $\Delta E$ , maior a diferença total de cor do produto processado em relação ao natural. Assim, observa-se que os valores de  $\Delta E$  obtidos no presente trabalho apresentaram diferença de cor perceptíveis ao olho humano e sendo classificados como muito distintos ( $\Delta E > 3$ ).

#### **5.4.4 Compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (AA)**

Os resultados de CFT da oleína e dos extratos oleosos apresentados na Tabela 13 variaram entre 6,34 e 12,36 mg de AGE/ g de amostra. Esses resultados mostram o benefício proporcionado pelo enriquecimento da oleína com a ASX extraída do coproduto do camarão-rosa. A EAE combinada com a EAU promoveu o aumento dos CFT em cerca de 1,9 vezes, quando são comparados os resultados da amostra oleína com a amostra mistura (Tabela 13). Os valores de CFT obtidos neste estudo foram superiores ao reportado por Corbu et al. (2019) ao estudarem o enriquecimento de óleos vegetais comestíveis com carotenoides extraídos do coproduto do *Hippophae rhamnoides* ssp. *Sinensis*, onde a média de CFT foi de 2,82 mg de AGE/ g de óleo.

Outro estudo apresentou resultado semelhante ao do presente trabalho, onde Mezzomo et al. (2015) encontraram 14,0 mg de AGE/ g de óleo obtido por



meio de extração com fluido supercrítico, a partir do coproduto do camarão *Penaeus brasiliensis*. Cabe descartar que no trabalho de Mezzomo et al. (2015) o coproduto era composto pelo cefalotórax, carapaça e cauda do crustáceo, enquanto que no nosso estudo o coproduto era composto essencialmente pelo cefalotórax do animal.

**Tabela 13.** Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da oleína e dos extratos oleosos

Parâmetros	Amostra				
	Oleína	Controle <sup>1</sup>	Alcalase	Flavourzyme	Mistura <sup>2</sup>
CFT	6,34 ± 0,69	7,50 ± 0,23	11,37 ± 1,31	8,08 ± 0,56	12,36 ± 1,76
AA	1,48 ± 0,07	1,85 ± 0,11	2,83 ± 0,19	2,11 ± 0,07	2,59 ± 0,09

<sup>1</sup>Amostra sem adição de enzima e tempo de incubação de 90 min.; <sup>2</sup>Mistura 1:1 (v,v) de alcalase e flavourzyme; CFT = compostos fenólicos totais (mg AGE/g de amostra); AA = atividade antioxidante ( $\mu$ mol de TE/ g de amostra); TE = trolox equivalente.

Os valores de CFT para os extratos obtidos com a alcalase e com a mistura das enzimas foram estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) e apresentaram os melhores resultados. Isso reforça a hipótese de que, de um modo geral, a enzima flavourzyme isolada proporcionou uma ação menos efetiva na desconstrução da estrutura da amostra do coproduto e isso influenciou o acesso do solvente aos compostos fenólicos do cefalotórax. A amostra controle também foi analisada para verificar se o uso das enzimas foi relevante no resultado de CFT e esta apresentou apenas  $7,50 \pm 0,23$  mg de AGE/ g.

Vale destacar que o cefalotórax do camarão é formado principalmente pelo sistema digestivo do animal, onde associamos como sendo provavelmente a origem dos compostos fenólicos encontrados nos extratos. Esses compostos são oriundos da alimentação deste animal que comumente consome plantas marinhas e algas em seu habitat natural (MEZZOMO et al., 2011).

Com relação aos resultados de AA, os dados da Tabela 13 mostram que todos os extratos eliminaram relativamente o radical ABTS quando comparado com a oleína. Segundo Fassett e Coombes (2011), estudos experimentais confirmam que a ASX tem uma grande capacidade de neutralizar os radicais livres ou outra atividade oxidante nas zonas não polares (hidrofóbicas) de agregados de fosfolípidios, bem como ao longo de suas zonas limítrofes polares (hidrofílicas).

Os valores de AA foram todos estatisticamente diferentes entre si, de acordo com o teste ANOVA fator único ( $p > 0,05$ ). Verificou-se também uma relação diretamente proporcional entre os valores de AA e a concentração de ASX dos extratos. A faixa de variação da AA foi de 1,48 a 2,83  $\mu\text{mol}$  de TE/ g de amostra (Tabela 13). Esse resultado foi semelhante aos dados reportados por Eren et al. (2019) cuja AA encontrada está entre 1,0 e 2,0  $\mu\text{mol}$  de TE/ mL em formulações de hidrogel e lipogel compostas por oleorresina ou extrato de algas, ambos contendo ASX. No estudo citado acima, os autores consideraram os resultados satisfatórios e indicaram o uso das formulações de lipogel e hidrogel como cosméticos.

Em outro estudo realizado por Gorinstein et al. (2003), avaliando a atividade antioxidante de alguns azeites espanhóis, esses reportaram valores de AA na faixa de 0,78 a 2,64  $\mu\text{mol}$  de TE/ g de azeite, compatíveis com o intervalo de AA reportado no presente trabalho. Vale também destacar que o percentual de aumento na AA da oleína enriquecida com ASX variou na faixa de 25,0 a 91,2 %.

#### **5.4.5 Composição de ácidos graxos**

A composição percentual de ácidos graxos na oleína e nos extratos obtidos por EAE combinada com EAU é apresentada na Tabela 14.

De forma geral, verificou-se por meio do teste estatístico ANOVA fator único, a inexistência de efeito significativo ( $p > 0,05$ ) da variação da composição de ácidos graxos entre todas as amostras. As amostras são caracterizadas por um conteúdo de ácidos graxos na ordem: ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) > ácidos graxos saturados (SFA) > ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), preservando a composição de ácidos graxos da oleína de palma, que neste estudo foi utilizada como solvente verde. Cabe destacar que a composição da oleína apresentou um perfil de ácidos graxos semelhante aos descritos em inúmeros trabalhos disponíveis na literatura (GESTEIRO; GALERA-GORDO; GONZÁLEZ-GROSS, 2018; MAHJOOB et al., 2018; MACHADO et al., 2018; VOON et al., 2019).

**Tabela 14.** Composição de ácidos graxos da oleína e dos extratos oleosos

Ácido Graxo	Oleína	Alcalase	Flavourzyme	Mistura <sup>1</sup>
C8:0	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
C10:0	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00
C12:0	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,01
C14:0	0,83 ± 0,00	0,85 ± 0,01	0,89 ± 0,03	0,83 ± 0,00
C15:0	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
C16:0	35,68 ± 0,05	35,54 ± 0,04	35,54 ± 0,03	35,87 ± 0,01
C16:1	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,01
C17:0	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01
C18:0	4,44 ± 0,05	4,42 ± 0,01	4,44 ± 0,02	4,38 ± 0,02
C18:1	48,36 ± 0,05	48,01 ± 0,03	48,08 ± 0,01	47,80 ± 0,01
C18:2	9,14 ± 0,01	9,62 ± 0,02	9,54 ± 0,02	9,57 ± 0,03
C18:3	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,00
C20:0	0,33 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,00
C22:0	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00
ΣSFA	41,99	41,83	41,87	42,12
ΣMUFA	48,49	48,18	48,22	47,95
ΣPUFA	9,51	9,99	9,91	9,93

<sup>1</sup>Mistura 1:1 (v,v) de alcalase e flavourzyme; SFA = ácidos graxos saturados; MUFA = ácidos graxos monoinsaturados; PUFA = ácidos graxos poli-insaturados.

#### 5.4.6 Conclusão do tópico 04

Os resultados das análises complementares efetuadas neste tópico mostram os benefícios proporcionados pelo enriquecimento da oleína com a ASX extraída do coproduto do camarão-rosa. Concluimos que a ASX é um composto antioxidante natural com alto potencial no retardo ou na prevenção da oxidação lipídica, capaz de melhorar características cromáticas dos óleos e influenciar na intenção de compra do consumidor. Cabe também destacar o bom desempenho da enzima alcalase e a sua sinergia com a técnica de sonicação na melhoria dos parâmetros avaliados neste tópico. Outro destaque é o possível efeito aditivo da mistura entre a enzima alcalase e flavourzyme.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O coproduto do camarão-rosa é um material de baixo custo com potencial para ser explorado como fonte natural do carotenoide ASX, cuja demanda é crescente nos campos de composto bioativo e corante alimentício. Além disso, o aproveitamento deste coproduto na obtenção de ingredientes com alto valor agregado é uma alternativa ao descarte do cefalotórax como resíduo industrial, evitando assim, a perda de substâncias de elevado valor nutricional e funcional.

O coproduto em pó obtido através da secagem em leito de jorro resultou em um produto com alto teor de proteínas, cinzas e lipídios. É importante destacar a presença dos ácidos graxos essenciais, linoleico e alfa-linolênico, e também dos ácidos graxos de importante valor nutritivo como o eicosapentaenoico (EPA) e o docosaexaenoico (DHA).

Ao alterar a temperatura de secagem, houve a mudança da umidade e da concentração de ASX do produto final. Conclui-se que o melhor resultado foi obtido no coproduto seco a 70 °C e submetido à extração com oleína a 70 °C, onde foi possível recuperar 31,3 µg de ASX/ g de coproduto em pó.

Em relação à cinética de extração e à modelagem matemática, o ajuste realizado com o modelo cinético de transferência de massa proposto apresentou  $R^2 > 0,96$  em todas as extrações, portanto, é possível afirmar que houve um ótimo ajuste dos dados experimentais ao modelo teórico.

A recuperação de ASX pelo método de EAE combinada com EAU é promissora por não utilizar solventes derivados do petróleo e não gerar resíduos tóxicos. Quanto ao tratamento térmico realizado no coproduto, este promoveu um aumento na eficiência de extração da ASX, sendo considerado como uma etapa importante não apenas para a extração deste carotenoide, mas também para inativar enzimas endógenas e melhorar propriedades físicas e microbiológicas do material.

Os melhores resultados de ASX extraída por EAE combinada com EAU foram obtidos a partir da hidrólise com a enzima alcalase isolada. As diferenças nos mecanismos de ação das enzimas alcalase e flavourzyme geraram diferentes produtos e, portanto, afetou a quantidade de ASX liberada para extração.

Os extratos oleosos apresentaram coloração alaranjada e diferenças totais de cor classificadas como “muito distinto” e perceptíveis ao olho humano ( $\Delta E > 3,0$ ). Todos os extratos apresentaram elevados valores de estabilidade

oxidativa e valores satisfatórios de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Em relação à estabilidade térmica, os extratos oleosos obtidos com tratamento enzimático apresentaram maior resistência ao calor devido à presença da ASX em concentrações relevantes.

A alta estabilidade oxidativa e térmica dos extratos é de extrema importância para a sua aplicação em processos industriais. Há também um interesse no uso da ASX na avicultura e na piscicultura, uma vez que este pigmento não é sintetizado por animais e deve ser adicionado como ingrediente nas rações. Tão ou mais importante quanto a sua aplicação como corante, são as propriedades funcionais da ASX, cuja capacidade de neutralizar radicais livres é uma funcionalidade altamente valorizada no campo da alimentação humana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107 – 113, 2007.
- AMBATI, R. R.; PHANG, S. M.; RAVI, S.; ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. **Marine drugs**, 12(1), 128-152, 2014.
- AMIGUET, V. T.; KRAMP, K. L.; MAO, J.; MCRAE, C.; GOULAH, A.; KIMPE, L. E.; BLAIS, J. M.; ARNASON, J. T. Supercritical carbon dioxide extraction of polyunsaturated fatty acids from Northern shrimp (*Pandalus borealis* Kreyer) processing by-products. **Food Chemistry**, 130(4), 853-858, 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Food Science and Technology**, 28(2), 498-502, 2008.
- ANTUNES-VALCAREGGI, S. A.; FERREIRA, S. R.; HENSE, H. Enzymatic hydrolysis of blue crab (*Callinectes Sapidus*) waste processing to obtain chitin, protein, and astaxanthin-enriched extract. **International Journal of Environmental and Agriculture Research**, 3(1), 81-92. 2017.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of Analysis**. 16<sup>o</sup> ed., 3<sup>rd</sup>ver., 1997.
- AOCS (American Oil Chemists Society). **Official methods of Analysis**, 5<sup>th</sup> ed., Washington, 2001.
- ABRAPALMA. **Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/oleo-da-palma-no-dia-a-dia/>>. Acesso: 25 jun. 2021.
- APATA, D. F.; BABALOLA, T. O. The use of cassava, sweet potato and cocoyam, and their by-products by non-ruminants. **International journal of food science and nutrition engineering**, 2(4), 54-62, 2012.
- AQUINO, A. C. M. S.; SILVA, M. H. M.; ROCHA, A. K. S.; CASTRO, A. A. Estudo da influência de diferentes tempos e métodos de cocção na estabilidade dos teores de clorofila e ácido ascórbico em brócolis (*Brassica oleraceae*). **Scientia Plena**, 7(1), 2011.
- ARAL, S.; BEŞE, A. V. Convective drying of hawthorn fruit (*Crataegus* spp.): Effect of experimental parameters on drying kinetics, color, shrinkage, and rehydration capacity. **Food chemistry**, v. 210, p. 577-584, 2016.
- ARAGÃO, J. A. N.; CINTRA, I. H. A.; SILVA, K. C. A. Pesca industrial do camarão-rosa na plataforma continental amazônica: aspectos da dinâmica da população, avaliação do estoque e influência dos parâmetros ambientais. **Actapesca**, [s.l.], p.77-90, 2015.

ARAUJO, G. S.; MATOS, L. J.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J.; GONÇALVES, L. R.; FERNANDES, F. A.; FARIAS, W. R. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics sonochemistry**, 20(1), 95-98, 2013.

ARAUJO, W. M. C.; MONTEBELLO, N. D. P.; BOTELHO, R. B.; BORGIO, L. A. **Alquimia dos alimentos**. 3. ed. Brasília: SENAC, 312 p., 2014.

ARAÚJO, A. D. A.; COELHO, R. M.; FONTES, C. P. M.; SILVA, A. R. A.; DA COSTA, J. M. C.; RODRIGUES, S. Production and spouted bed drying of acerola juice containing oligosaccharides. **Food and Bioproducts Processing**, 94, 565-571, 2015.

ARAUJO, N. M. P.; PEREIRA, G. A.; ARRUDA, H. S.; PRADO, L. G.; RUIZ, A. L. T. G.; EBERLIN, M. N., CASTRO, R. J. S.; PASTORE, G. M. Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenantha pavonina* L. seeds. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, p. 101002, 2019.

ASSANVO, E. F.; KALITA, M.; SAIKIA, M.; BARUAH, S. D. Aqueous extraction of Ricinodendron heudelotii oil and direct miniemulsion polymerization of the oil-in-water fraction. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 30-37, 2016.

AZMIR J.; Z Aidul I.S.M.; RAHMAN M.M.; SHARIF K.M.; MOHAMED A.; SAHENA F.; JAHURUL M.H.A.; GHAFoor K.; NORULAINI N.A.N.; OMAR A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. 4. 426-436, 2013.

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

BAIANO, A. Recovery of biomolecules from food wastes – A review. **Molecules**, 19(9), 14821-14842, 2014.

BEZERRA, T. S. **Caracterização física, química e morfológica de polpa de marolo liofilizada**. 141f. 2014. Tese de Doutorado. Tese-Doutorado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

BIRKELAND, S.; BJERKENG, B. Extractabilities of astaxanthin and protein from muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by brine concentration and pH. **Food chemistry**, 85(4), 559-568, 2004.

BONGONI, R.; VERKERK, R.; STEENBEKKERS, B.; DEKKER, M.; STIEGER, M. Evaluation of different cooking conditions on broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) to improve the nutritional value and consumer acceptance. **Plant foods for human nutrition**, 69(3), 228-234, 2014.

BORGUINI, R. G.; PACHECO, S.; CHÁVEZ, D. W. H.; COUTO, G. A.; WILHELM, A. E.; SANTIAGO, M. C. P. D. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; JESUS, M. S. C.; GODOY, R.

L. D. O. Carotenoid extraction using edible vegetable oil: an enriched provitamin A product. **Scientia Agricola**, 78, 2020.

BOTTERWECK, A. A.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, 38(7), 599-605, 2000.

BRASILEIRO, O. L.; CAVALHEIRO J. M. O.; PRADO, J. P. S.; ANJOS, A. G.; CAVALHEIRO, T. T. B. C. Determination of the chemical composition and functional properties of shrimp waste protein concentrate and lyophilized flour. **Ciência Agrotecnologia**, 36 (2), 189-194, 2012.

BRITO, A. S.; ARIMATÉIA, D. S.; SOUZA, L. R.; LIMA, M. A.; SANTOS, V. O.; MEDEIROS, V. P.; FERREIRA, P. A.; SILVA, R. A.; FERREIRA, C. V.; JUSTO, G. Z.; LEITE, E. L.; ANDRADE, G. P. V.; OLIVEIRA, F. W.; NADER, H. B.; CHAVANTE, S. F. Anti-inflammatory properties of a heparin- like glycosaminoglycan with reduced anti-coagulant activity isolated from a marine shrimp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, 9588–9595, 2008.

CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S.F.; CARVALHO JR., L. B.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**. 47:570-577, 2012.

CALVO-BRENES, P.; O'HARE T. Effect of freezing and cool storage on carotenoid content and quality of zeaxanthin-biofortified and standard yellow sweet-corn (*Zea mays* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, 86, 103353, 2020.

CAPARINO, O. A.; TANG J., NINDO, C. I.; SABLANI, S. S.; POWERS J. R.; FELLMAN J. K. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao' var.) powder. **Journal of Food Engineering**, 111, 135–148, 2012.

CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvent. **Green Chemistry**, 9, 927–934, 2007.

CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; MULET, A.; RODRÍGUEZ, L.; RIERA, E. Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves. **Physics Procedia**, v. 3, n. 1, p. 147-152, 2010.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. Natural food additives: Quo vadis?. **Trends in Food Science & Technology**, 45(2), 284-295, 2015.

CASTRO, M. D. L.; CAPOTE, F. P. Analytical applications of ultrasound. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**, v. 26, 413 p. 2007.



CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p.1189–1195, 2011.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, 24(1), 173-187, 2011.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18 p. 813–835, 2011.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics sonochemistry**, 34, 540-560, 2017.

CHEMAT, F.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A. S.; STRUBE, J.; UHLENBROCK, L.; GUNJEVIC, V.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 118, 248-263, 2019.

CHEN, H. M.; MEYERS, S. P. A rapid quantitative determination of astaxanthin pigment concentrate in oil extraction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 6, p. 1045-1047, 1984.

CHOCIAI, M. B.; MACHADO, I. M. P.; FONTANA, J. D.; CHOCIAI, J. G.; BUSATO, S. B.; BONFIM, T. M. B. Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, n. 4, p. 457-462, 2002.

CHUTIA, H.; MAHANTA, C. L. Green ultrasound and microwave extraction of carotenoids from passion fruit peel using vegetable oils as a solvent: Optimization, comparison, kinetics, and thermodynamic studies. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 67, p. 102547, 2021.

CORBU, A. R.; ROTARU, A.; NOUR, V. Edible vegetable oils enriched with carotenoids extracted from by-products of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*): the investigation of some characteristic properties, oxidative stability and the effect on thermal behaviour. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 1-13, 2019.

CORREA, N. C. F.; MACEDO, C. S.; MORAES, J. F. C.; MACHADO, N. T.; FRANÇA, L. F. Characteristics of the extract of *Litopenaeus vannamei* shrimp obtained from the cephalothorax using pressurized CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 176–180, 2012.

CORSINI, M. D. S.; JORGE, N.; MIGUEL, A. M. R. D. O.; VICENTE, E. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. **Química Nova**, 31(5), 956-961, 2008.

CUI, H.; GRACE, J. R. Spouting of biomass particles: A review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4008-4020, 2008.

DENPASA – Dendê do Pará S/A. **Óleo de Palma**. Disponível em: <<http://denpasa.com.br/pt-br/oleo-de-palma-utilizacao/>>. Acesso: 25 jun. 2021.

DEVAHASTIN, S.; TAPANAYASIN, R.; TANSAKUL, A. Hydrodynamic behavior of a jet spouted bed of shrimp. **Journal of Food Engineering**, 74 (3), 345–351, 2006.

DIAS-NETO, J. Proposta de plano nacional de gestão para o uso sustentável de camarões marinhos do Brasil. **Série Plano de Gestão Recursos Pesqueiros**, v. 3, 2011.

DINÇER, İ.; ZAMFIRESCU, C. **Drying phenomena: theory and applications**. John Wiley & Sons, 2016.

DOTTO, G. L.; SOUZA, V. C.; PINTO, L. A. A. Drying of chitosan in a spouted bed: The influences of temperature and equipment geometry in powder quality. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 1786-1792, 2011.

DUARTE, C. R. **Estudo experimental e de simulação da fluidodinâmica e recobrimento em leito de jorro**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2006.

DWECK, J.; SAMPAIO, C. M. S. Analysis of the thermal decomposition of commercial vegetable oils in air by simultaneous TG/DTA. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 75, n. 2, p. 385-391, 2004.

ENRÍQUEZ-FERNÁNDEZ, B. E.; YANEZ, L. A. C.; SOSA-MORALES, M. E. Comparison of the stability of palm olein and a palm olein/canola oil blend during deep-fat frying of chicken nuggets and French fries. **International Journal of Food Science and Technology**, vol. 46, p. 1231–1237, 2011.

EREN, B.; TUNCAY TANRIVERDI, S.; AYDIN KÖSE, F.; ÖZER, Ö. Antioxidant properties evaluation of topical astaxanthin formulations as anti-aging products. **Journal of cosmetic dermatology**, 18(1), 242-250, v.

ESCLAPEZ, M. D.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; MULET, A.; CÁRCEL, J. A. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, 3(2), 108-120, 2011.

FANG, X.; MOREAU, R. A. Extraction and demulsification of oil from wheat germ, barley germ, and rice bran using an aqueous enzymatic method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 91(7), 1261-1268, 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em:< <https://www.sealifebase.ca/summary/Farfantepenaeus-subtilis.html>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

FASSETT, R.G.; COOMBES, J. S. Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. **Marine Drugs**, 9: 447-465, 2011.

FRANCO-ZAVALETA M.E.; JIMÉNEZ-PICHARDO, R.; TOMASINI-CAMPOCOSIO, A.; GUERRERO-LEGARRETA, I. Astaxanthin extraction from shrimp wastes and its stability in 2 model systems. **Journal of Food Science**. 75(5):394–9, 2010.

FREIRE, J. T. Secagem de pasta em leite de jorro. In: FREIRE, J. T.; SARTORI, D. J. M. **Tópicos Especiais em Secagem**, São Carlos: Ed. UFSCar, v. 1, p. 45-85, 1992.

FREIRE, J. T.; FERREIRA M. C.; FREIRE, F. B. **Drying of solutions, slurries, and pastes: In: EPSTEIN, N; GRACE, J. R. Spouted and Spout-Fluid Beds**. Cambridge: Cambridge University Press, v. 1, Cap.12, p. 206-221, 2011.

GARCÍA-MARTÍNEZ, O.; MAZZAGLIA, G.; SÁNCHEZ-ORTIZ, A.; OCAÑA-PEINADO, F.M.; RIVAS, A. Phenolic content of Sicilian virgin olive oils and their effect on MG-63 human osteoblastic cell proliferation. **Grasas y Aceites**, v. 65, e032, 2014.

GARDOSSI, L.; POULSEN, P. B.; BALLESTEROS, A.; HULT, K.; ŠVEDAS, V. K.; VASIĆ-RAČKI, Đ.; CARREA, G.; MAGNUSSON, A.; SCHMID, A.; WOHLGEMUTH, R.; HALLING, P. J. Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. **Trends in biotechnology**, 28(4), 171-180, 2010.

GBOGOURI, G. A.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. **Journal of food science**, 69(8), C615-C622, 2004.

GESTEIRO, E.; GALERA-GORDO, J.; GONZÁLEZ-GROSS, M. Aceite de palma y salud cardiovascular: consideraciones para valorar la literatura. **Nutrición hospitalaria**, 35(5), 1229-1242, 2018.

GHAFOOR, K.; HUI, T.; CHOI, Y. H. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. **Journal of Food Biochemistry**, 35(3), 735-746, 2011.

GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8-9, p. 09-812, 2001.

GOMES, F. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**. v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O.; KATRICH, E.; LOJEK, A.; ČÍŽ, M.; GLIGELMO-MIGUEL, N.; HARUENKIT, R.; PARK, Y. S.; JUNG, S. T.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by

four different radical scavenging tests. **The Journal of nutritional biochemistry**, 14(3), 154-159, 2003.

GUERARD F.; SUMAYA-MARTINEZ M. T.; LAROQUE D.; CHABEAUD A.; DUFOSSE L. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. **Process Biochemistry**, 42, 1486–1491, 2007.

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

GUZMÁN, E. C. **Bioquímica de pescados e derivados**. Campinas: Editora Funep, 1994. 409p.

HAMERSKI, L.; REZENDE, M. J. C.; DA SILVA, B. V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 394-420, 2013.

HAMMAMI, C.; RENÉ, F. Determination of freeze-drying process variables for strawberries. **Journal of Food Engineering**, v. 32, p. 133-154, 1997.

HANDAYANI, A. D.; INDRASWATI, N.; ISMADJI, S. Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: studies of extraction kinetics and thermodynamic. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4414-4419, 2008.

HERNÁNDEZ BECERRA, J. A.; FLORES, A. A. F.; VALERIO-ALFARO, G.; SOTO-RODRIGUEZ, I.; RODRÍGUEZ-ESTRADA, M. T.; GARCÍA, H. S. Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage. **Food Chemistry**, v. 145, p. 832-839, 2014.

HERRERA, M. C.; DE CASTRO, M. L. Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 379(7), 1106-1112, 2004.

HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography a**, 1217(16), 2495-2511, 2010.

HEU, M.; KIM, J.; SHAHIDI, F. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. **Food Chemistry**, v. 82, p. 235-242, 2003.

HIGUERA-CIAPARA, I; FELIX-VALENZUELA, L; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 185–196, 2006.

HO, Y.; OFOMAJA, A. E. Kinetic studies of copper ion adsorption on palm kernel fibre. **Journal of hazardous materials**, v. 137, n. 3, p. 1796-802, 2006.

HOLANDA, H. D.; NETTO, F. M. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. **Journal of food science**, 71(5), C298-C303, 2006.

HONORATO, G. C. **Concepção de um secador rotatório para secagem do cefalotórax do camarão**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2006.

HUA, K.; COBCROFT, J. M.; COLE, A.; CONDON, K.; JERRY, D. R.; MANGOTT, A., PRAEGER, C.; VUCKO, M. J.; ZENG, C.; ZENGER, K.; STRUGNELL, J. M. The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. **One Earth**, v. 1, n. 3, p. 316-329, 2019.

HORŽIĆ, D.; JAMBRAK, A. R.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; KOMES, D.; LELAS, V. Comparison of conventional and ultrasound assisted extraction techniques of yellow tea and bioactive composition of obtained extracts. **Food and Bioprocess Technology**, 5(7), 2858-2870, 2012.

HUSSEIN, G.; SANKAWA U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 443-449, 2006.

HUSSEIN, M. A. Cardioprotective effects of astaxanthin against isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, 5(335), 2, 2015.

IBRAHIM, H. M.; SALAMA, M. F.; EL-BANNA, H. A. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, 43 (6), 418-423, 1999.

JAPÓN-LUJÁN, R.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Liquid-liquid extraction for the enrichment of edible oils with phenols from olive leaf extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 2505–2511, 2008.

JAYATHILAKAN, K.; SULTANA, K.; RADHAKRISHNA, K.; BAWA, A. S. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of food science and technology**, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JEON, Y. C.; CHO, C. W.; YUN, Y. S. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. **Enzyme and microbial technology**, 39(3), 490-495, 2006.

JOHN, L. 2012. **Economia Verde**. Disponível em: <<http://viajeaqui.abril.com.br/materias/economia-verde#5>>. Acesso em: 15 mai. 2015.

JOHNSON, E. A., AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Reviews in Biotechnology** 11(4), 297-326, 1991.

KAKUDA, Y.; KASSAM L.S. Supercritical Fluid Technology for Extraction of Bioactive Components. In: **Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies**. Ed. SHI JOHN, CRC Press, 2006.

KALA, A.; PRAKASH, J. The comparative evaluation of the nutrient composition and sensory attributes of four vegetables cooked by different methods. **International journal of food science & technology**, 41(2), 163-171, 2006.

KETNAWA, S.; MARTÍNEZ-ALVAREZ, O.; GÓMEZ-ESTACA, J.; DEL CARMEN GÓMEZ-GUILLÉN, M.; BENJAKUL, S.; RAWDKUEN, S. Obtaining of functional components from cooked shrimp (*Penaeus vannamei*) by enzymatic hydrolysis. **Food bioscience**, 15, 55-63, 2016.

KHAN, M. K.; ABERT-VIAN, M.; FABIANO-TIXIER, A. S.; DANGLES, O.; CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chemistry**, 119(2), 851-858, 2010.

KIEVIET, F.; KERKHOF, P. J. A. M. Measurements of particle residence time distributions in a co-current spray dryer. **Drying Technology**, 13, 1241–1248, 1995.

KIRANOUDIS, C. T.; MAROULIS, Z. B.; MARINOS-KOURIS, D. Drying of solids: Selection of some continuous operation dryer types. **Computers & chemical engineering**, v. 20, p. S177-S182, 1996.

KÖPSEL, C. *et al.* Structure investigations on assembled astaxanthin molecule. **Journal of Molecular Structure**, v. 750, p. 109-115, 2005.

KUMAR, S.; AALBERSBERG, B. Nutrient retention in foods after earth-oven cooking compared to other forms of domestic cooking: 2. Vitamins. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19(4), 311-320, 2006.

KUMAR, S. J.; PRASAD, S. R.; BANERJEE, R.; AGARWAL, D. K.; KULKARNI, K. S.; RAMESH, K. V. Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2017.

LABRADOR, V.; FREIRE, P. F.; MARTÍN, J. P.; HAZEN, M. J. Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole in Vero cells. **Cell biology and toxicology**, 23(3), 189-199, 2007.

LEE, J. K.; JEON, J. K.; BYUN, H. G. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. **Food Chemistry**, 125(2), 495-499, 2011.

LEPAGE, G.; ROY, C. C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. **Journal of Lipid Research**. v. 25, p. 1391-1396, 1984.

LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A.S.; 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. **Ultrasonics Sonochemistry**, 20, 12–18, 2013.

LIU, J. J.; GASMALLA, M. A. A.; LI, P.; YANG, R. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: Principle, processing and application. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 35, p. 184-193, 2016.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of biological chemistry**, 283(45), 30433, 2008.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**, 18, 160–167, 2000.

MA, Q.; XU, X.; GAO, Y.; WANG, Q.; ZHAO, J. Optimisation of supercritical carbon dioxide extraction of lutein esters from marigold (*Tagetes erecta* L.) with soybean oil as a co-solvent. **International Journal of Food Science & Technology**, 43, 1763–1769, 2008.

MACHADO, A. D. F.; WILHELM, A. E.; GUEDES, A.; BIZZO, H.; OLIVEIRA, M. E. C.; YOKOYAMA, R.; BORGES, P. P. V.; ANTONIASSI, R. Óleo de palma de alto oleico produzido no Brasil. In **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE HORTICULTURA, 1, 2018, Lisboa. Lisboa: Associação Portuguesa de Horticultura, mar. 2018. p. 581-586. (Actas Portuguesas de Horticultura, 29). Suporte eletrônico, 2018.

MAHJOOB, R.; NAFCHI, A. M.; AMIRI, E. O.; FARMANI, J. An investigation on the physicochemical characterization of interesterified blends of fully hydrogenated palm olein and soybean oil. **Food science and biotechnology**, 27(2), 343-352, 2018.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Carotenoids of yeasts isolated from Brazilian ecosystem. **Food Chemistry**. 107 (Suppl 1): 145-150, 2008.

MARTINS, V. G.; COSTA, J. A. V.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Hidrolisado protéico de pescado obtido por vias química e enzimática a partir de corvina (*Micropogonias furnieri*). **Química nova**, 32(1), 61-66, 2009.

MATHUR, K.; EPSTEIN, N. **Spouted beds**. Nova York: Academic Press, 1974. 303p.

MEJIDO, M. J. **Métodos de cocção**. Rio de Janeiro: Editora Multifoco, 58 p., 2012.

MERHAN, O. The biochemistry and antioxidant properties of carotenoids. **Carotenoids**, 5, 51, 2017.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: propriedades, aplicações e mercado. **Revista virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.

MEZZOMO, N.; MAESTRI, B.; SANTOS, L. R.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R.S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, 85 (2011) 1383-1391.

MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Supercritical fluid extraction of carotenoid fraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 22-33, 2013.

MEZZOMO, N.; TENFEN, L.; FARIAS, M. S.; FRIEDRICH, M. T.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Evidence of anti-obesity and mixed hypolipidemic effects of extracts from pink shrimp (*Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*) processing residue. **The Journal of Supercritical Fluids**, 96, 252-261, 2015.

MORTENSEN, A.; SKIBSTED, L. H.; SAMPSON, J.; RICE-EVANS, C.; EVERETT, S. A. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. **FEBS letters**, 418(1-2), 91-97, 1997.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. Disponível em: <<http://www.abc.gov.br/zopacas/informacoes/instituicaoempa.aspx>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

MPA. **Ministério da Pesca e Aquicultura**. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**: Brasil 2011. MPA- Brasília 2012.

MUJUMDAR, A. S. **Handbook of Industrial Drying**. New York: Marcel Dekker Inc., Cap. 9, 295-326, 1987.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 4, p. 1150-1154, 2000.

NÈGRE-SADARGUES, G.; CASTILLO, R.; SEGONZAC, M. Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocarididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 127(3), 293-300, 2000.

NIKSIAR, A.; NASERNEJAD, B. Activated carbon preparation from pistachio shell pyrolysis and gasification in a spouted bed reactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 106, p. 43-50, 2017.

NIKHITA, R.; SACHINDRA, N. M. Optimization of chemical and enzymatic hydrolysis for production of chicken blood protein hydrolysate rich in angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity. **Poultry Science**, 100(5), 101047, 2021.

NIAMNUY, C.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S.; RAGHAVAN, G. S. V. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. **Journal of Food Engineering**, 87, 591– 600, 2008.

NIAMNUY, C.; KERDPIBOON, S.; DEVAHASTIN, S. Artificial neural network modeling of physicochemical changes of shrimp during boiling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 110–116, 2012.

NIELSEN, B. R.; MORTENSEN, A.; JØRGENSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Singlet versus triplet reactivity in photodegradation of C40 carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2106-2113, 1996.



NIRMAL, N. P.; SANTIVARANGKNA, C.; RAJPUT, M. S.; BENJAKUL, S. Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

NOUR, V.; CORBU, A. R.; ROTARU, P.; KARAGEORGOU, I.; LALAS, S. Effect of carotenoids, extracted from dry tomato waste, on the stability and characteristics of various vegetable oils. **Grasas y Aceites**, 69(1), 238, 2018.

OBENG, G. Y.; ADJALOO, M. K.; DONKOR P. Effect of temperature, moisture content, particle size and roasting on shea butter extraction efficiency. **International Journal of Food Engineering**, 06, 01-11, 2010.

OGAWA, M.; MAIA, E. L.; FERNANDES, A. C.; NUNES, M. L.; OLIVEIRA, M. E. B. D.; FREITAS, S. T. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenóides. **Food Science and Technology**, 27(2), 333-337, 2007.

OGUZ, M. **Biochemistry and Antioxidant Properties of Carotenoids**. p. 51-66, 2017.

OLAYIWOLA, I. O.; ABUBAKAR, H. N.; ADEBAYO, G. B.; OLADIPO, F. O. Study of sweet potato (*Ipomea batatas* Lam) foods for indigenous consumption through chemical and anti-nutritive analysis in Kwara State, Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**, 8(12), 1894-1897, 2009.

OLIVEIRA, E. G.; ROSA, G. S.; MORAES, M. A.; PINTO, L. A. A. Phycocyanin content of *Spirulina platensis* dried in spouted bed and thin layer. **Journal of Food Process Engineering**, 31, 34-50, 2008.

OLIVEIRA, S. M.; BRANDAO, T. R.S.; SILVA, C. L.M. Influence of drying processes and pretreatments on nutritional and bioactive characteristics of dried vegetables: A review. **Food Engineering Reviews**, v. 8, n. 2, p. 134-163, 2016.

ORREGO-ALZATE, C. E. **Congelación y Liofilización de Alimentos**. Universidad Nacional de Colombia, Manizales, 172 p., 2008.

ORIO, L.; ALEXANDERU, L.; CRAVOTTO, G.; MANTEGNA, S.; BARGE, A. UAE, MAE, SFE-CO<sub>2</sub> and classical methods for the extraction of *Mitragyna speciosa* leaves. **Ultrasonics Sonochemistry**. 19: 591- 595, 2012.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 373–378, 2005.

PABLOS, A.; AGUADO, R.; TELLABIDE, M.; ALTZIBAR, H.; FREIRE, F. B.; BILBAO, J.; OLAZAR, M. A new fountain confinement device for fluidizing fine and ultrafine sands in conical spouted beds. **Powder Technology**, 328, 38-46, 2018.

PADUANO, A.; CAPORASO, N.; SANTINI, A.; SACCHI, R. Microwave and ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from chili peppers (*Capsicum annuum* L.) in flavored olive oil. **Journal of Food Research**, 3, 51–59, 2014.

PALMERO, P.; LEMMENS, L.; HENDRICKX, M.; VAN LOEY, A. Role of carotenoid type on the effect of thermal processing on bioaccessibility. **Food chemistry**, 157, 275-282, 2014.

PARJIKOLAEI, B. R.; EL-HOURI, R. B.; FRETTE, X. C.; CHRISTENSEN, K. V. Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste. **Journal of Food Engineering**, 155, 22-28, 2015.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; ABREU, C. M. Secagem de material vegetal em forno de microondas para determinação de matéria seca e análises químicas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1252-1258, 2002.

PASSOS, M. L.; MASSARANI, G.; FREIRE, J. T.; MUJUMDAR, A. S. Drying of pastes in spouted beds of inert particles: design criteria and modeling. **Drying Technology**, v. 15, n. 2, p. 605-624, 1997.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. **Food and bioprocess technology**, 6(1), 36-60, 2013.

PATTANAIK, S. S.; SAWANT, P. B.; XAVIER, K. M.; DUBE, K.; SRIVASTAVA, P. P.; DHANABALAN, V.; CHADHA, N. K. Characterization of carotenoprotein from different shrimp shell waste for possible use as supplementary nutritive feed ingredient in animal diets. **Aquaculture**, v. 515, p. 734594, 2020.

PU, J.; BECHTEL, P. J.; SATHIVEL, S. Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates. **Biosystems Engineering**, 107, 364–371, 2010.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in biotechnology**, 30(1), 37-44, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay Free Radical. **Biology & Medicine**, Vol. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RIBEIRO, H. S.; RICO, L. G.; BADOLATO, G. G.; SCHUBERT, H. Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. **Journal of food science**, v. 70, n. 2, p. E117-E123, 2005.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. **Invertebrados: Manual de aulas práticas**. 2ª Ed. São Paulo: Holas Editora, 2006.

RODRIGUES, A.M.C; DARNET, S.H; SILVA, L.H. Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocayum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripi*) Fruits. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 21, p.2000-2004, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods**. Arlington, U.S. Agency for International Development, 88p, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; GODOY, H. T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, 21(6), 445-463, 2008.

RODRÍGUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, 109(1), 98-103, 2012.

ROSA, P. T. V.; PARAJO, J. C.; DOMINGUEZ, H.; MOURE, A.; DIAZ-REINOSO, B.; SMITH, R. L.; MASAOKI, TOYOMIZU, JR.; FLORUSSE, L. J.; PETERS, C. J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M. A. M. Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to the Food Industry. In: **Extracting Bioactive Compounds for Food products, Theory and Applications**. Editor M.A.A Meireles. CRC Press, 2008.

ROY, V. C.; GETACHEW, A. T.; CHO, Y. J.; PARK, J. S.; CHUN, B. S. Recovery and bio-potentialities of astaxanthin-rich oil from shrimp (*Penaeus monodon*) waste and mackerel (*Scomberomous niphonius*) skin using concurrent supercritical CO<sub>2</sub> extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, 159, 104773, 2020.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Manage**, 26, 1092-1098, 2006.

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

SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S. Effect of protease treatment on oil extractability of carotenoids from shrimp waste. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 20(1), 22-31, 2011.

SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M.; JINAP, S.; SAARI, N.; JAHURUL, H. A.; ABBAS, K. A.; NORULAINI, N. A. PUFAs in fish: extraction, fractionation, importance in health. **Comprehensive Reviews in food science and food safety**, 8(2), 59-74, 2009.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MARTINEZ-CORREA, H. A.; PAVIANI, L. C.; CABRA, F. A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantapenaeus paulensis*). **The Journal of Supercritical Fluids**, 56,164–173, 2011.

SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MEIRELES, M. A. A; FERREIRA, A. L. K.; SAITO, E.; CABRAL, F. A. Extraction of  $\omega$ -3 fatty acids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste using supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol mixtures. **Journal of Supercritical Fluids**, 61, 71-77, 2012.

SANTOS, J. C.; HOMMA, A.; SENA, A. D. S.; MENEZES, A. J. E. A. **Avaliação do desempenho econômico e do potencial de geração de renda da estrutura produtiva de pequena escala de dendezeiro híbrido interespecífico na mesorregião metropolitana de Belém, Pará**. In: Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA

DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 55, 2017, Santa Maria, RS. Inovação, extensão e cooperação para o desenvolvimento. Brasília, DF: SOBER, 2017.

SATHASIVAM, R.; KI, J. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. **Marine drugs**, v. 16, n. 1, p. 26, 2018.

SEABRA, L. M. A. J.; CHAVES, K. S. F. S.; DAMASCENO, C. R. D. S.; GOMES, C. C.; PEDROSA, L. F. C. Carotenoides totais em resíduos do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ceres**, v. 61, n. 1, p. 130-133, 2014.

SENPHAN, T.; BENJAKUL, S. Compositions and yield of lipids extracted from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as affected by prior autolysis. **Food chemistry**, 134(2), 829-835, 2012.

SHARMA, A.; KHARE, S. K.; GUPTA, M. N. Enzyme-assisted aqueous extraction of rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 78(9), 949-951, 2001.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. **Chemical Engineering and Processing**, v. 53, p.10–23, 2012.

SILA, A.; SAYARI, N.; BALTI, R.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; NEDJAR-ARROUME, N.; MONCEF, N.; BOUGATEF, A. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction of carotenoproteins generated from shrimp by-products by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, 148, 445–452, 2014.

SILVA, D. M.; DAMASCENO, K. S.; RIBEIRO, P. P.; ALCÂNTRA, M. A.; CORDEIRO, A. M.; PASSOS, T. S., SOUSA JR, S. C.; ASSIS, C. F. D. Chemical Characteristics and Antioxidant Activity of Astaxanthin Extracted from Shrimp Residues Using Soybean Oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, p. 1277-1285, 2021.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SNOWMAN, J. W. **Freeze Dryers**. In: BAKER, C. G. J.. Industrial Drying of Foods, pp 134 145, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1997.

SOARES, E. 2013. **Zoologia de invertebrados**. Disponível em:< <http://pt.slideshare.net/emanuelbio/diagnose-de-filos-invertebrados>>. Acesso em 22 jun. 2021.

SOARES, A. C.; PEREIRA, N. R. Secagem da polpa de jabolão (*Syzygium cumini*) em secador de leito de jorro: efeito da clara de ovo como agente carreador de secagem na qualidade do produto. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

SOWMYA, R.; SACHINDRA, N. M. Carotenoids in aquatic resources: occurrence, recovery, application and biofunctions. In: Yamaguchi, M. (Ed.), **Carotenoids: Properties, Effects and Diseases**. Nova Publishers, USA, p.75–118, 2011.

SUKOR, N.; JUSOH, R.; RAHIM, S. A.; KAMARUDIN, N. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phenolic acids from *Quercus Infectoria* galls. **Materials Today: Proceedings**, 5(10), 21990-21999, 2018.

SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**, 37, 397–408, 2006.

TACON, L. A.; FREITAS, L. A. A. Paste residence time in a spouted bed dryer. III: effect of paste properties and quality interactions. **Drying Technology**, 25, 841-852, 2007.

TEIXEIRA, C. B.; MACEDO G. A.; MACEDO, J. A.; SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. da C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource technology** 129C:575-581, 2013.

TOLEDO, T. C. F. D.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. **Food Science and Technology**, 28(2), 355-360, 2008.

TRUNG, T. S.; PHUONG, P. T. D. Bioactive compounds from by-products of shrimp processing industry in Vietnam. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 1, p. 194-197, 2012.

TSIAKA, T.; ZOUMPOULAKIS, P.; SINANOGLU, V. J.; MAKRIS, C.; HEROPOULOS, G. A.; CALOKERINOS, A. C. Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp. **Analytica chimica acta**, v. 877, p. 100-110, 2015.

USDA. **United States Department of Agriculture**. National Organic Program. Disponível em: <<https://www.ams.usda.gov/about-ams/programs-offices/national-organic-program>>. Acesso: 22 jun. 2021.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatization of olive oil with basil. **Food Chemistry**, v. 123, p. 905–911, 2010.

VIEIRA, M. A.; OLIVEIRA, D. D.; KUROZAWA, L. E. Production of peptides with radical scavenging activity and recovery of total carotenoids using enzymatic protein hydrolysis of shrimp waste. **Journal of Food Biochemistry**, 40(4), 517-525. 2016.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 9(2), 161-169, 2008.

VOON, P. T.; LEE, S. T.; NG, T. K. W.; NG, Y. T.; YONG, X. S.; LEE, V. K. M.; ONG, A. S. H. Intake of palm olein and lipid status in healthy adults: A meta-analysis. **Advances in Nutrition**, 10(4), 647-659, 2019.

WEI, C. K.; THAKUR, K.; LIU, D. H.; ZHANG, J. G.; WEI, Z. J. Enzymatic hydrolysis of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein and sensory characterization of Maillard reaction products. **Food chemistry**, 263, 186-193, 2018.

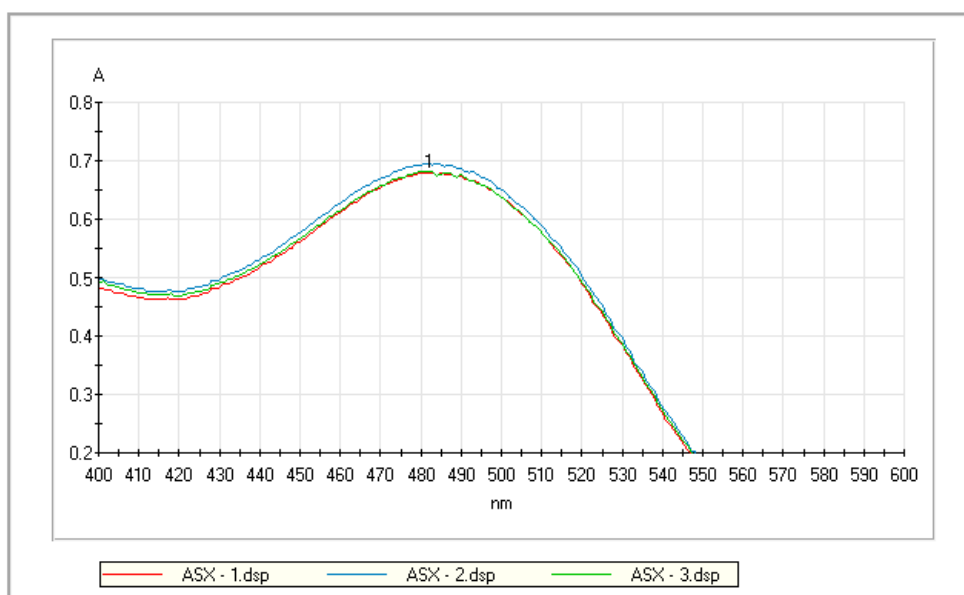
WIJNGAARD, H.; HOSSAIN M. B.; RAI D. K.; BRUNTON N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. **Food Research International**, 46, 505–513, 2012.

YARA-VARON, E.; FABIANO-TIXIER, A. S.; BALCELLS, M.; CANELA-GARAYOA, R.; BILY, A.; CHEMAT, F. Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. **RSC Advances**, v. 6, n. 33, p. 27750-27759, 2016.

YU, J.; VASANTHAN, T.; TEMELLI, F. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(9), 4352-4358, 2001.

## APÊNDICE

### APÊNDICE 1 – ESPECTRO UV-VIS DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ASTAXANTINA EM OLEÍNA



ASX - 1.dsp

Maxima            Threshold: 0,01 A  
1 482 nm;        0,680 A

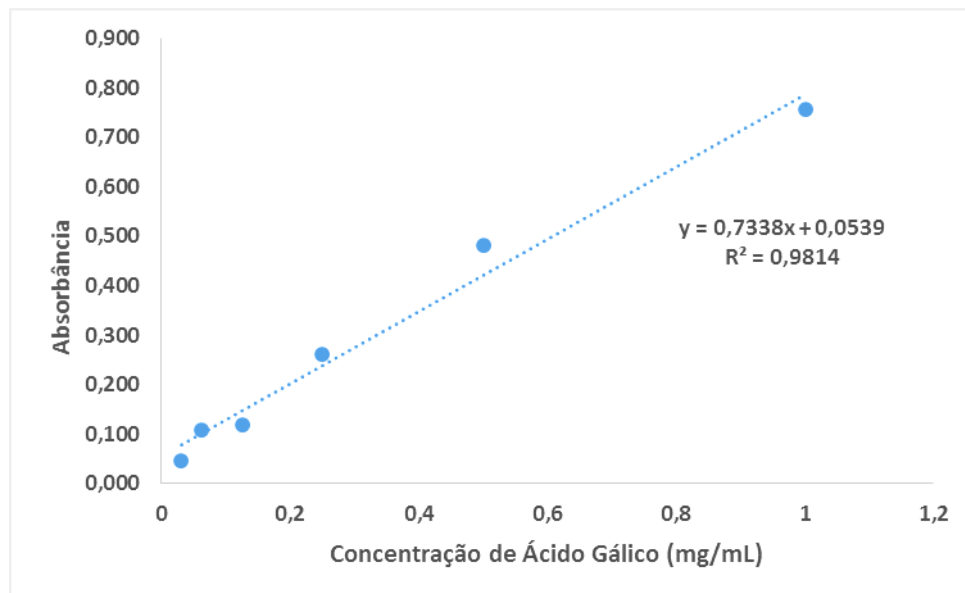
ASX - 2.dsp

Maxima            Threshold: 0,01 A  
1 482 nm;        0,695 A

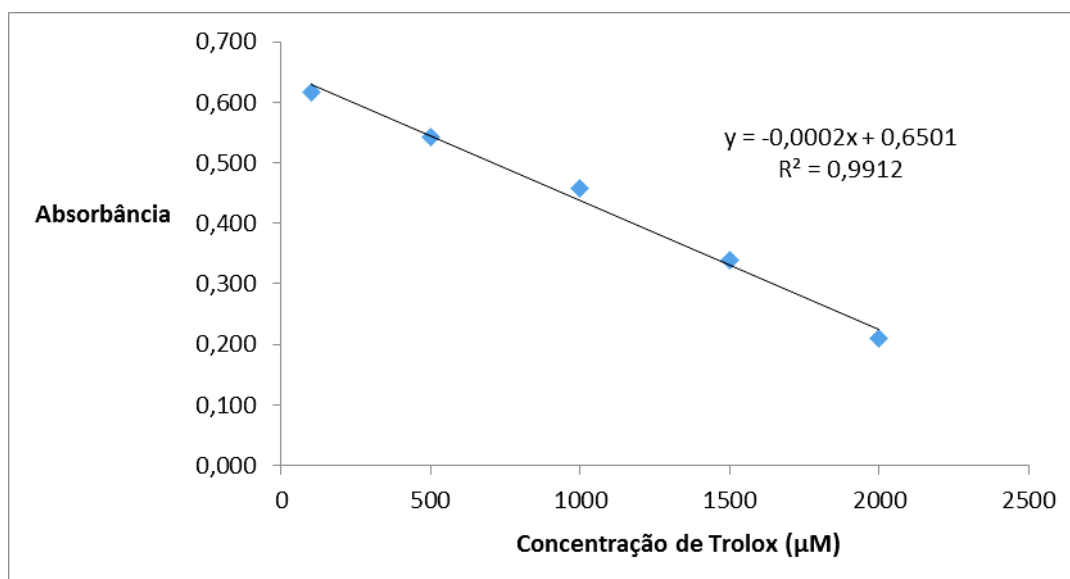
ASX - 3.dsp

Maxima            Threshold: 0,01 A  
1 482 nm;        0,683 A

## APÊNDICE 2 – CURVA-PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO



## APÊNDICE 3 – CURVA-PADRÃO DO TROLOX®






## ANEXOS

## ANEXO A – FICHA DE INFORMAÇÃO DA ENZIMA ALCALASE

## Ficha de Informação do Produto



1 de 2

Válido a partir de 2014-04-11

### Alcalase® 2.4 L FG

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por serina endoprotease, que hidrolisa ligações peptídicas internas

#### CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	protease (Subtilisina)
Atividade declarada	2,4 AU-A/g
Cor	marrom claro a escuro
Apresentação	Líquido
Densidade de aproximadamente (g/ml)	1,17

*A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.*

#### ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Protease unit AU-A	2,4		/g
Contagem total de viáveis	-	50000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E. Coli	Não detectado		/25 g
Salmonella	Não detectado		/25 g
Metais pesados		Máx 30	mg/kg
Chumbo		Máx 5	mg/kg
Arsênico		Máx 3	mg/kg
Cádmio		Máx 0.5	mg/kg
Mercurio		Máx 0.5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

#### COMPOSIÇÃO

Ingredientes	% aprox. (p/p)
Glicerol, CAS no. 56-81-5	50
Água, CAS no. 7732-18-5	41
Protease (Subtilisina), CAS no. 9014-01-1*	9

\*Definido como enzima conc. (base matéria seca)

#### INFORMAÇÃO SOBRE ALERGIA

Alergênico	Substância contida <sup>1</sup>	Alergênico	Substância contida <sup>1</sup>
Carne bovina	não	Lactose	não
Cenoura	não	Leguminosas	não
Alpo	não	Tremoço	não
Cereais contendo glúten <sup>2</sup>	não	Leite	não
Carne de frango	não	Moluscos	não
Cacau	não	Mostarda	não
Coentro	não	Nozes <sup>3</sup>	não
Milho	não	Amendoim	não
Crustáceos	não	Carne de porco	não
Ovo	não	Gergelim	não
Peixe	não	Soja	não
Glutamato	não	Dióxido de enxofre/sulfitos, mais que 10 mg por kg ou l	não

<sup>1</sup>Definição de substâncias de acordo com LeDa/ALBA e o Regulamento 1169/2011 da União Europeia

<sup>2</sup>Isto é, trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, kamut

<sup>3</sup>Isto é, amêndoa, avelã, noz, castanha de caju, noz-pecã, castanha do Pará, pistache, macadâmia e noz de Queensland

#### VALORES NUTRICIONAIS

O produto possui um valor nutricional típico de aproximadamente 653 kJ/100 g produto enzimático.

• Proteína	9 g/100 g
• Polióis	50 g/100 g
• Umidade	41 g/100 g

#### STATUS GM

Este produto não é um OGM.

Organismo de produção

Bacillus licheniformis

O produto enzimático é produzido por fermentação de um microrganismo que não está presente no produto final. O organismo de produção não é modificado usando uma biotecnologia moderna.

# Novozymes®

## 2.4 L FG

novozymes

2 de 2

### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

**Temperatura de armazenamento:** 0-10 °C (32-50 °F)

A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Siga as recomendações e use o produto antes da data de validade expirar para evitar a necessidade de uma dosagem maior.

**Melhor utilizar antes de:** A data de validade encontra-se no certificado de análise ou na embalagem do produto.

O produto oferece desempenho ideal quando armazenado conforme recomendado e usado dentro de 24 meses da data de produção.

A Novozymes garante a entrega pelo menos 6 meses antes da data de validade.

O produto pode ser entregue em temperatura ambiente. Após a entrega, o produto deve ser armazenado conforme recomendado a 0-10°C/32-50°F.

### EMBALAGEM

O produto está disponível em diferentes tipos de embalagem. Entre em contato com o representante de vendas para mais informações.

### PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E MANUSEIO

Enzimas são proteínas. A inalação de poeira ou aerossóis pode induzir sensibilização e causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Algumas enzimas podem irritar a pele, os olhos e as membranas mucosas em caso de contato prolongado. Veja a FISPQ ou o Manual de Segurança para mais informações sobre como manusear o produto com segurança e o que fazer em caso de derramamento.

### CONFORMIDADE

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Os certificados Kosher e Halal encontram-se disponíveis no Customer Center ou com o representante de vendas.

### CERTIFICAÇÕES

A Novozymes é signatária do Pacto Global das Nações Unidas, da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica e reportamos o nosso desempenho de sustentabilidade através da Global Reporting Initiative (GRI). Ver todos os nossos compromissos no âmbito da sustentabilidade em [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com).



### SEGURANÇA ALIMENTAR

A Novozymes conduziu uma análise de risco e preparou um plano APPCC descrevendo os pontos críticos de controle (PCCs). O plano APPCC é respaldado por um amplo programa de pré-requisitos implementado nas Boas Práticas de Fabricação da Novozymes.

O produto é fabricado de acordo com o plano APPCC da Novozymes, as BPF e outros requisitos do Sistema de Gestão de Qualidade Novozymes.

O produto está em conformidade com os requisitos de pureza relacionados à micotoxinas recomendados pelo JECFA FAO/OMS e FCC. O produto está em conformidade com a legislação sobre pesticidas da UE.

O produto é produzido em conformidade com a certificação FSSC 22000.



Novozymes Latin America Ltda.  
Rua professor Francisco Ribeiro 683  
CEP 83707-660 - Araucária - Paraná  
Brasil

Tel. +55 41 641 1000  
Fax +55 41 643 1443


Para mais informações, ou endereços de nossos escritórios, visite: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

A legislação, a regulamentação e/ou os direitos de terceiros podem impedir os clientes de importar, utilizar, processar e/ou revender os produtos aqui mencionados de determinada maneira. Sem um acordo em separado e por escrito entre o cliente e a Novozymes com essa finalidade, este documento não se constitui em uma representação ou garantia de qualquer espécie e está sujeito a alterações sem aviso prévio.

© Novozymes A/S

## ANEXO B – FICHA DE INFORMAÇÃO DA ENZIMA FLAVOURZYME

## Ficha de Informação do Produto



**novozymes**  
Rethink Tomorrow

1 de 2  
Válido a partir de 2014-03-19

# Flavourzyme®

## 1000 L

Neste produto a atividade enzimática chave é fornecida por exopeptidase, que libera aminoácidos por hidrólise da ligação peptídica N-terminal

### CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

Enzima Declarada	Aminopeptidase
Atividade declarada	1000 LAPU/g
Atividades secundárias	O produto apresenta atividade de protease
Cor	marrom claro a escuro
Apresentação	Líquido
Propriedades	O produto pode apresentar turbidez e conter pequena quantidade de precipitado, isto não afeta a atividade enzimática ou desempenho.
Densidade de aproximadamente (g/ml)	1,27

*A cor pode variar de um lote para outro. A intensidade da cor não é um indicativo da atividade enzimática.*

### INFORMAÇÃO SOBRE ALERGIA

Alergénico	Substância contida <sup>1</sup>	Alergénico	Substância contida <sup>1</sup>
Carne bovina	não	Lactose	não
Centoura	não	Leguminosas	não
Aipo	não	Tremoço	não
Cereais contendo glúten <sup>2</sup>	não	Leite	não
Carne de frango	não	Moluscos	não
Cacau	não	Mostarda	não
Coentro	não	Nozes <sup>3</sup>	não
Milho	não	Amendoim	não
Crustáceos	não	Carne de porco	não
Ovo	não	Gergelim	não
Peixe	não	Soja	não
Glutamato	não	Dióxido de enxofre/sulfitos, mais que 10 mg por kg ou l	não

<sup>1</sup>Definição de substâncias de acordo com LeDa/ALBA e o Regulamento 1169/2011 da União Europeia

<sup>2</sup>Isto é, trigo, centeio, cevada, aveia, espelta, kamut

<sup>3</sup>Isto é, amêndoa, avelã, noz, castanha de caju, noz-pecá, castanha do Pará, pistache, macadâmia e noz de Queensland

### ESPECIFICAÇÃO DO PRODUTO:

	Limite Inferior	Limite Superior	Unidade
Aminopeptidase unit LAPU	1000		/g
Contagem total de viáveis	-	10000	/g
Bactéria Coliforme	-	30	/g
E.Coli	Não detectado		/25 g
Salmonella	Não detectado		/25 g
Metais pesados		Máx 30	mg/kg
Chumbo		Máx 5	mg/kg
Arsénico		Máx 3	mg/kg
Cádmio		Máx 0.5	mg/kg
Mercúrio		Máx 0.5	mg/kg

O método analítico da enzima está disponível no Portal do Cliente (Customer Centre) ou com o seu representante de vendas.

### COMPOSIÇÃO

Ingredientes	% aprox. (p/p)
Água, CAS no. 7732-18-5	42,80
Sacarose, CAS no. 57-50-1	30
Aminopeptidase, CAS no. 9001-61-0*	17
Cloreto de potássio, CAS no. 7447-40-7	10
Sorbato de potássio, CAS no. 24634-61-5	0,20

\*Definido como enzima conc. (base matéria seca)

### VALORES NUTRICIONAIS

O produto possui um valor nutricional típico de aproximadamente 801 kJ/100 g produto enzimático.

• Proteína	17 g/100 g
• Carboidrato	30 g/100 g
• Ácido orgânico	0 g/100 g
• Cinza	10 g/100 g
• Umidade	43 g/100 g

### STATUS GM

Este produto não é um OGM.

Organismo de produção Aspergillus oryzae

O produto enzimático é produzido por fermentação de um microrganismo que não está presente no produto final. O organismo de produção não é modificado usando uma biotecnologia moderna.



L

#### CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Temperatura de armazenamento: 0-10 °C (32-50 °F)

A embalagem deve ser mantida intacta, seca e ao abrigo da luz. Siga as recomendações e use o produto antes da data de validade expirar para evitar a necessidade de uma dosagem maior.

**Melhor utilizar antes de:** A data de validade encontra-se no certificado de análise ou na embalagem do produto.

O produto oferece desempenho ideal quando armazenado conforme recomendado e usado dentro de 24 meses da data de produção.

A Novozymes garante a entrega pelo menos 6 meses antes da data de validade.

#### PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA E MANUSEIO

Enzimas são proteínas. A inalação de poeira ou aerossóis pode induzir sensibilização e causar reações alérgicas em indivíduos sensibilizados. Algumas enzimas podem irritar a pele, os olhos e as membranas mucosas em caso de contato prolongado. Veja a FISPQ ou o Manual de Segurança para mais informações sobre como manusear o produto com segurança e o que fazer em caso de derramamento.

#### CONFORMIDADE

O produto está em conformidade com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício definidas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) e o Food Chemicals Codex (FCC).

Os certificados Kosher e Halal encontram-se disponíveis no Customer Center ou com o representante de vendas.

#### CERTIFICAÇÕES

A Novozymes é signatária do Pacto Global das Nações Unidas, da Convenção das Nações Unidas sobre Diversidade Biológica e reportamos o nosso desempenho de sustentabilidade através da Global Reporting Initiative (GRI). Ver todos os nossos compromissos no âmbito da sustentabilidade em [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com).



#### SEGURANÇA ALIMENTAR

A Novozymes conduziu uma análise de risco e preparou um plano APPCC descrevendo os pontos críticos de controle (PCCs). O plano APPCC é respaldado por um amplo programa de pré-requisitos implementado nas Boas Práticas de Fabricação da Novozymes.

O produto é fabricado de acordo com o plano APPCC da Novozymes, as BPF e outros requisitos do Sistema de Gestão de Qualidade Novozymes.

O produto está em conformidade com os requisitos de pureza relacionados à micotoxinas recomendados pelo JECFA FAO/OMS e FCC. O produto está em conformidade com a legislação sobre pesticidas da UE.

O produto é produzido em conformidade com a certificação FSSC 22000.



#### EMBALAGEM

O produto está disponível em diferentes tipos de embalagem. Entre em contato com o representante de vendas para mais informações.

Novozymes Latin America Ltda.  
Rua professor Francisco Ribeiro 683  
CEP 83707-660 - Araucária - Paraná  
Brasil

Tel. +55 41 641 1000  
Fax +55 41 643 1443

Para mais informações, ou endereços de nossos escritórios, visite: [www.novozymes.com](http://www.novozymes.com)

A legislação, a regulamentação e/ou os direitos de terceiros podem impedir os clientes de importar, utilizar, processar e/ou revender os produtos aqui mencionados de determinada maneira. Sem um acordo em separado e por escrito entre o cliente e a Novozymes com essa finalidade, este documento não se constitui em uma representação ou garantia de qualquer espécie e está sujeito a alterações sem aviso prévio.