

Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) como biofilme protetor em caju

Bruno Sales de Oliveira¹ & Maria Lúcia Nunes²

¹Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Tiradentes, Aracaju SE, Brasil

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristovão SE, Brasil
eng.brunosales@hotmail.com

(Recebido em 9 de março de 2011; aceito em 7 de abril de 2011)

O Estado de Sergipe apresenta um volume de consumo muito grande de caranguejo-uçá, correspondendo a 100.000 unidades/ mês, aproximadamente, o que gera um considerável volume de resíduos (70 a 80%), após a retirada da carne. Uma forma de agregar valor a estes resíduos é através da produção de quitosana. O biopolímero β -(1-4)-D-glicosamina, denominado de quitosana, pode ser utilizado em um grande número de aplicações industriais, dentre as quais se destacam: biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedade antimicrobiana, emulsificante, quelante, além do uso como filmes comestíveis e protetores de frutas. O presente trabalho teve como objetivo obter quitosana a partir de resíduos de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) e avaliar o seu potencial como filme protetor em caju. Os resíduos de caranguejo-uçá foram triturados, desmineralizados, desproteinizados, neutralizados, secos, obtendo-se assim a quitina. A partir da desacetilação alcalina da quitina com NaOH a 50%, obteve-se a quitosana. Foram elaboradas soluções de quitosana, em ácido acético 0,5 M, em diferentes concentrações, as quais foram aplicadas como revestimentos protetores em cajus, estocados à temperatura ambiente. A solução de quitosana na concentração de 15g/L apresentou os melhores resultados.

Palavras chave: Quitina, resíduos de crustáceos, desacetilação alcalina, biofilme, coberturas comestíveis

The State of Sergipe has a very large volume of consumption of land crab, representing over 100,000 units per month, which generates a considerable volume of waste (70-80%), after removing the meat. One way to add value to the waste of crab is through the production of chitosan. The biopolymer- β (1-4)-D-glucosamine, called chitosan, can be used in a wide range of industrial applications, among which are: biocompatibility, biodegradability, antimicrobial property, emulsifier, chelating agent, as well as the use of edible films and protectors of fruit. This study aimed to obtain chitosan from waste land crab (*Ucides cordatus*) and evaluate its potential as a protective film on cashew. The waste land crab were ground, demineralized, deproteinized, neutralized, dried, thus obtaining chitin. The chitosan was obtained after the alkaline deacetylation of chitin with 50% NaOH. Chitosan solutions were prepared in 0.5 M acetic acid with different concentrations, which were applied as protective films in cashews and stored at room temperature. The solution of chitosan in concentrations of 15g / L showed the best results.

keywords: Chitin, residues of crustaceans, alkaline desacetylation, biofilm, edible coatings.

1. INTRODUÇÃO

O biopolímero β -(1-4)-D-glicosamina, denominado “quitosana”, pode ser obtido a partir de resíduos de crustáceos sendo inúmeras as possibilidades de aproveitamento em diversos produtos com vasta aplicação na indústria química e de alimentos além das áreas médicas e farmacêuticas, destacando-se por suas propriedades de: biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedade antimicrobianas, emulsificante, quelante, além do uso como filmes comestíveis e protetores de frutas. Considerando que a captura de caranguejo-uçá, (*Ucides cordatus*), no estado de Sergipe é uma atividade economicamente importante, cujo consumo corresponde a um total superior a 100.000 unidades/ mês, o que gera um considerável volume de resíduos (70 a 80%), após a retirada da carne os quais podem ser direcionados para a obtenção de quitosana.

O desenvolvimento de quitosana a partir de resíduos de crustáceos tem sido largamente estudado [1, 2 e 3], cujas características do produto são dependentes da origem da matéria-prima e da metodologia empregada. Alguns estudos vêm direcionando o seu emprego como coberturas de alimentos ou revestimentos protetores em frutas e legumes minimamente processados [4, 5]. Muitas destas pesquisas enfocam, essencialmente, as propriedades antifúngicas e antibacterianas da quitosana [6]. As coberturas denominadas “comestíveis” são tecnologias recentes, aprimoradas na última década, em decorrência da

oferta de produtos minimamente processados e pelo impacto ambiental provocado pela degradação muito lenta das embalagens convencionais de alimento. O seu principal papel é atuar como uma barreira à perda de umidade, controlar a respiração do fruto e evitar contaminações microbiológicas e químicas [7]. Embora algumas pessoas possam apresentar reações alérgicas a crustáceos, o uso de quitosana obtida da carapaça dos mesmos, como embalagem comestível, em alimentos não parece ser inadequado considerando a baixíssima concentração em que a mesma é utilizada na obtenção dos biofilmes. A quitosana tem sido encontrada com um **LD 50** [8] o que corresponderia com cerca de 16 gramas/dia por cada kg de peso corpóreo de um camundongo, sendo assim o **LD 50** relativo em humanos desta maneira seria de 1,33 gramas/dia por Kg de peso corporal. Para uma pessoa de 70 Kg a quantidade tóxica então seria maior do que 90 gramas de quitosana por dia. Os revestimentos comestíveis sobre os alimentos devem apresentar certas peculiaridades como ser invisíveis, terem aderência suficiente para não serem facilmente removidos no manuseio e não introduzirem alterações no gosto, propriedades estas inerentes a quitosana. Em virtude da importância deste biopolímero o presente trabalho teve como objetivo obter quitosana de resíduo de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) e avaliar o seu potencial como filme protetor em caju, durante a estocagem à temperatura ambiente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A matéria-prima constou de resíduos de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), adquirido na comunidade de catadores de caranguejo do Mosqueiro, município de Aracaju-Sergipe, após sofrerem secagem ao sol.

2.1. Pré-tratamento dos resíduos

Nos resíduos secos foi realizada apenas uma separação de materiais estranhos como partes de vegetais, porções de tecidos, papel e outros que eventualmente poderiam acompanhar o mesmo, submetendo-os a seguir a uma trituração em liquidificador industrial e nova secagem em estufa com circulação de ar a 50°C, por 2 horas. Após resfriamento foram moídos em moedor de facas obtendo-se assim uma “farinha de resíduo de caranguejo” a partir da qual se obteve a quitina para a elaboração da quitosana.

2.2. Processo de obtenção da quitina

Para a obtenção da quitina a partir da “farinha de resíduo de caranguejo” foram realizadas as seguintes operações: desmineralização, desproteínização, desodorização/despigmentação e secagem.

Desmineralização: Para a redução do teor de minerais foi utilizado solução de ácido clorídrico a 4% sob agitação, por um período de 1:30 h à temperatura ambiente.

Desproteínização: A matéria-prima desmineralizada foi submetida a uma hidrólise com solução de hidróxido de sódio 5% p/v, agitando-se por um período de 1:30 horas [9], à 60-70°C.

Desodorização/despigmentação: Consistiu em adicionar ao material desmineralizado e desproteínizado uma solução de hipoclorito de sódio/água a 0,36% v/v, agitando-se durante 1 hora à temperatura ambiente.

Neutralização: Entre as etapas de desmineralização, desproteínização e desodorização/despigmentação foram realizadas sucessivas neutralizações do material com água até pH neutro.

Secagem: O material desodorizado foi submetido à secagem em secador de bandejas à temperatura de 80°C por 3 horas, obtendo-se a quitina, seca, de modo que a sua umidade não alterasse a concentração de solução de NaOH (45°Bé) na etapa subsequente da desacetilação para obtenção da quitosana [9].

2.3. Processo de obtenção da quitosana

Para a produção da quitosana foi adicionada a quitina seca uma solução de hidróxido de sódio a 50% na proporção de 1:5 (quitina/solução) à temperatura de 90-100°C, durante o uma hora e meia, com agitação, seguida de lavagem com água corrente até a neutralização do pH do material, conforme parâmetros já estabelecidos na literatura [1,9]. A secagem da quitosana foi realizada em secador de bandejas, a 60°C por um período de 3 horas, até a umidade se situar entre 7 a 9%. Após a primeira moagem a quitosana apresentou uma granulometria correspondente a 9 mesh e quando submetido a uma segunda moagem atingiu a granulometria de 30 mesh. Ambos os produtos foram avaliados quanto ao grau de desacetilação.

2.4. Determinação do grau de desacetilação da quitosana

Foi realizada uma titulação potenciométrica para a quantificação dos grupamentos aminos presentes na estrutura das quitosanas de caranguejo. Uma solução de 0,2 g de quitosana diluída em 20 mL de ácido clorídrico 0,1 M e 100 mL de água destilada, foi titulada com uma solução de NaOH 0,1 M. A titulação foi realizada após 12 horas, para melhorar a solubilidade da quitosana. Foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL da solução titulante até atingir o pH final 12. O grau de desacetilação (GD) foi calculado em função da porcentagem dos grupamentos amino de acordo com a equação 1:

$$\% \overline{GD} = [M (V_2 - V_1) 161 \times 100] / W \quad (1)$$

Onde V_1 = volume de NaOH correspondente a neutralização do excesso de HCl na solução; V_2 = volume de NaOH correspondente a neutralização dos grupamentos amino presentes no polímero; M = concentração da solução de NaOH; W = massa da amostra de quitosana em mg. O valor 161 corresponde à massa equivalente a um monômero do polímero [10].

2.5. Processo de obtenção e aplicação dos filmes protetores

As soluções filmogênicas foram preparadas com concentrações de 3, 10, 15, 20 e 50 g/L de quitosana em solução de ácido acético 0,5 M, até equilíbrio em pH próximo a 3. Os caju foram adquiridos no mercado municipal da cidade de Aracaju, após 48 horas da colheita, previamente limpos em água corrente, sanitizados com cloro ativo ($2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e submersos nas respectivas soluções por um tempo de 6 a 8 segundos. O material retirado das soluções foi drenado com secagem natural e estocado em condições ambientais. Após 24 horas foi realizado um teste de aderência, por tentativa de remoção e raspagem do filme. Durante 3 dias de estocagem, nestas condições, a aparência dos frutos foi avaliada, visualmente e através de acompanhamento fotográfico para definir a melhor concentração filmogênica a ser empregada no processamento mínimo de caju.

2.6. Análises físico-químicas da quitosana

Foram realizadas análises químicas da farinha de resíduos de caranguejo, conforme suas granulometrias e da quitina e quitosanas obtidas, bem como o pH em das soluções filmogênicas em relação às suas concentrações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização química da farinha de resíduos, da quitina e quitosana

A caracterização química da farinha do resíduo de caranguejo, da quitina e da quitosana obtida pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal da farinha de resíduo caranguejo, quitina e quitosana (%)

	Farinha de resíduo	Quitina	Quitosana
Umidade	6,60	7,60	7,68
Cinzas	61,24	0,18	0,03
Lipídios	1,10	0,09	tr
Proteínas	13,20	Tr	tr
Carboidrato (*)	17,86	92,13	92,29

(*) Calculado por diferença; tr = traços

Observa-se que a farinha de resíduos de caranguejo apresentou um alto teor de mineral sendo este um dos fatores que dificulta o processo de desmineralização, na obtenção posterior de quitina. Em relação à umidade e lipídios a farinha, a quitina e a quitosana apresentaram teores compatíveis com a literatura.

Comparando-se os dados da farinha com os da quitina observa-se que houve uma acentuada redução no percentual de cinzas (99,70%) mostrando a eficiência da etapa de desmineralização.

3.2. Caracterização físico-química das quitosanas

A quitosana após sucessivas lavagens apresentou pH neutro, correspondente a 6,47 e grau de desacetilação compatível com a literatura (tabela 2).

Tabela 2. pH e grau de desacetilação (GD) das quitosanas de caranguejo, conforme suas granulometrias

<i>Parâmetros</i>	<i>Valores</i>
<i>pH</i>	6,47
<i>*GD (9 mesh)</i>	48,44%
<i>*GD (30 mesh)</i>	62,40%

A granulometria das partículas teve influência no grau de desacetilação das quitosanas. Partículas menores (mesh 30) favoreceram uma melhor solubilidade da quitosana e maior grau de desacetilação (62,40%), sendo, portanto, este produto selecionado na elaboração dos filmes protetores. Vale ressaltar que para a avaliação do GD (grau de desacetilação) em quitosana, vários métodos vêm sendo descritos na literatura dentre eles destacam-se, a titulação potenciométrica [10], espectroscopia UV [11], espectroscopia de infravermelho [12 e 13], espectroscopia de massa [14] e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) [15]. No entanto, selecionar o melhor método para a determinação do GD ainda tem sido motivo de muitas investigações. A titulação potenciométrica foi o método escolhido neste trabalho em função de sua simplicidade e precisão.

3.3. Aderência dos biofilmes

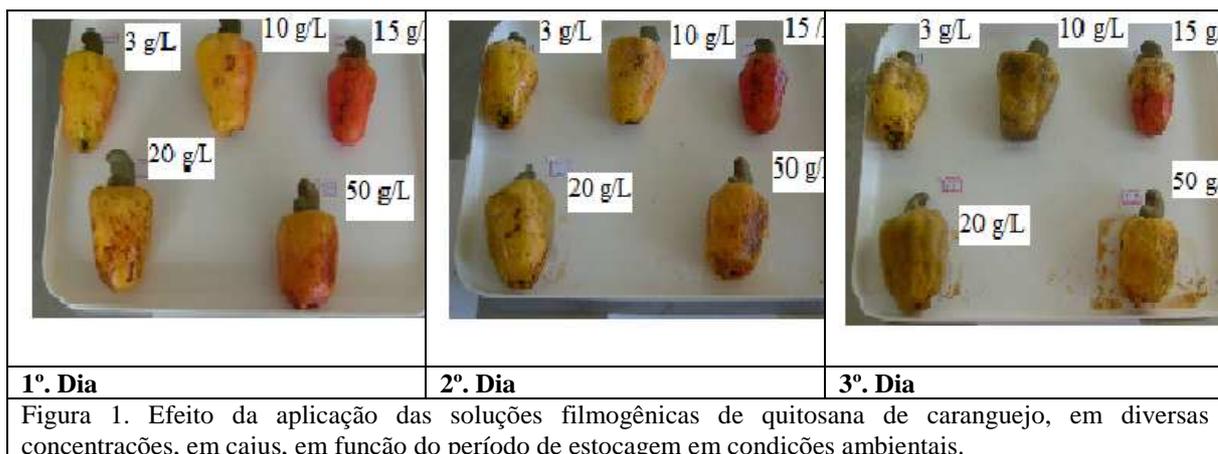
Os dados qualitativos de aderência do filme protetor, avaliados por tentativa de remoção e raspagem do filme, para as diversas concentrações de quitosana, após 24 horas de secagem podem ser visualizadas na tabela 3.

Tabela 3. Características de aderência dos filmes de quitosana

<i>Concentração de quitosana (g/l)</i>	<i>Aderência sobre a superfície do caju</i>
3,0	Boa
10,0	Boa
15,0	Boa
20,0	Fraca
50,0	Fraca

Observou-se que para concentrações de quitosana maiores de 15g/L o filme formava uma película mais espessa no fruto, facilmente removível por destacamento, sendo, portanto, avaliada como de fraca aderência. Uma possível razão para este comportamento pode estar relacionado à espessura e às características dos aglomerados de quitosana nos filmes formados, pois quanto maior a concentração, maior a formação de agregados ou materiais não totalmente dissolvidos no gel. Estes resultados corroboram aos de outros pesquisadores [16] de que a formação do filme espesso dará como resultado uma deposição conjunta desses agregados que ocorre de forma irregular, diminuindo a área efetiva de contato reduzindo, por conseguinte, a aderência do filme.

A aparência dos caju, revestidos com as diversas soluções filmogênicas, pode ser observada através da figura 1. Os caju após o primeiro e segundo dia de aplicação dos filmes de quitosana melhoraram a aparência, apresentando uma melhor coloração devido à aderência do filme de quitosana e mantendo o brilho. Visualmente não houve focos de contaminação e perda da integridade.



Durante o segundo dia observou-se um início de deterioração, apenas em caju revestido com filme de quitosana na concentração 50 g/L. Conforme quanto maior a concentração de quitosana maior a retenção de água pelo biofilme, acelerando os processos degradativos. O maior intumescimento do biofilme de quitosana reduz a aderência e assim pode gerar rupturas e escamações das camadas subjacentes, expondo a superfície a uma rápida ação bacteriana e ao crescimento de fungos [17]. No terceiro dia houve perda da integridade ficando a aparência, de todos os frutos, submetidos à aplicação dos filmes em todas as concentrações bastante comprometida, sugerindo a ocorrência de pontos de contaminação.

3.4. Variação do pH nas soluções filmogênicas em função da concentração da quitosana

A acidez do filme exerce também efeito sobre os processos degenerativos da cobertura. Os resultados têm indicado que maiores concentrações de quitosana alteram o pH inicial da diluição, com estabilização em valores mais alcalinos (figura 2).

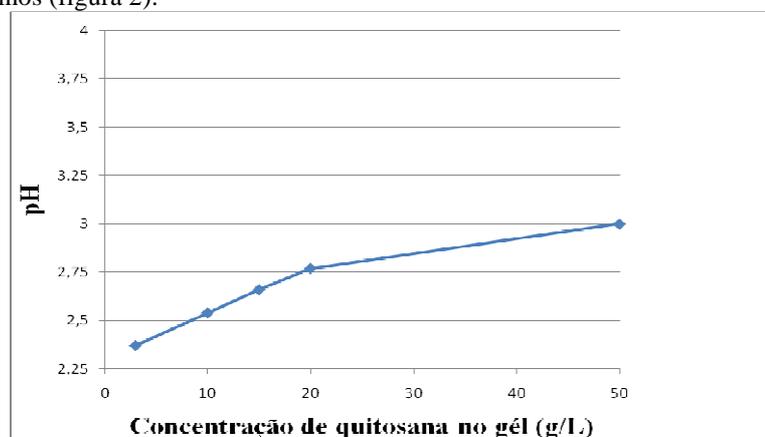


Figura 2. Variação do pH nas soluções filmogênicas

Na prática esta pequena alteração de pH mostra-se importante na aparência final das superfícies revestidas. Embora a solução ácida gere oxidações na superfície a ser revestida, observamos que o tempo em que os cajus foram imersos no gel (não superior a 6-8 segundos), aparentemente, não interferiu na coloração final da superfície revestida. As extensões dos danos provocadas pela ação ácida podem ser, em princípio, atenuadas pelo uso de agentes alcalinos que misturados ao gel ajustam o pH em níveis menos agressivos. Contudo, tentativas preliminares em reduzir o pH da solução de quitosana resultaram na formação de géis não satisfatórios para revestimentos [18]. Um revestimento polimérico ideal para uso em alimentos, evidentemente, deve ser completamente inerte, com ausência de impacto sobre a polpa ou introdução e alteração de cores na casca ou demais partes do fruto.

4. CONCLUSÃO

A quitosana obtida de resíduo de caranguejo apresentou um grau de desacetilação (GD) variável com a granulometria de suas partículas, superior ao mínimo recomendado na literatura ($GD \geq 40\%$), sendo possível o seu uso como filme protetor. Em condições ambientais, as concentrações filmogênicas aplicadas aos frutos apresentaram bons resultados na aparência de cajus, mantendo a integridade dos

mesmos até dois dias de estocagem, perfazendo assim uma vida útil de 4 dias após a colheita. As soluções filmogênicas de quitosana, de maior concentração (20 e 50g/L) foram facilmente removíveis por destacamento e, portanto, avaliadas como de fraca aderência. A solução de 15g/L ou 1,5% foi a que apresentou os melhores resultados.

1. MONTEIRO Jr, O. A. C ; NUNES, M. L, Obtenção de quitina e quitosana de resíduos do carangueijo-uçá (*Ucides cordatus*): otimização do processo. In: *Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos- Avanços e perspectivas*, Campinas, 1995.
2. SOARES, N. M.; MOURA, C. M.; RIZZI, J.; VASCONCELOS, S. R.; PINTO, L. A. A. Obtenção e purificação de quitosana a partir de resíduos de camarão em escala piloto. VI INIC – *Latino-Americano*, São José dos Campos, SP, 2002.
3. MOURA, J. M.; FERREIRA, A. F. C.; SILVA, F. M. M.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Obtenção de quitina a partir de carapaças de siri: uso de um planejamento experimental na etapa de desmineralização. *EQAMA – Encontro de Qualidade dos Alimentos e Meio Ambiente*, Rio Grande, 2004.
4. SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; YOU, J. J. Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 37-51, 1999.
5. COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 67, n. 3, p. 1162-1169, 2002.
6. NO, H. K.; PARJ, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 74, p. 65-72, 2002.
7. ASSIS, OBG.; LEONI, AM. “Filmes comestíveis de quitosana: Ação biofúngica sobre frutas fatiadas”, *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 30, p.33, 2003.
8. CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana: a fibra do futuro**. *Parque de Desenvolvimento Tecnológico – PADETEC*, Fortaleza, Ceará, 1999, 124p.
9. WESKA, R. F.; MOURA, J. M.; BATISTA, L. M.; RIZZI, J.; PINTO, L. A. A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of responde surface methodology. *Journal of Food Engineering*, vol. 80, p. 749-753, 2007.
10. BROUSSIGNAC, J. Un hault polymere naturel per connum dans l’industrie le chitosan, *Chimie et Industrie-Genie Chimique*, v.99, p.1241-1249, 1972.
11. TAN, C.S., KHOR, E., TAN, T.K, WONG, S.M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivave UV-spectrophotometry method of determination, *Talanta*, New York, v.45, p.713-719, 1998.
12. SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation od different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Biological Macromoléculas*, New York, v.18, p.237-242, 1996.
13. DUARTE, M.L. et al. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR espectroscopy. *Internatioal Journal of Biological Macromolecules*, London, v.31, p.1-8, 2002.
14. DUARTE, M.L. et al. Determination of the degree of acetylation of chitin materials by 13C CP/MAS NMR spectroscopy. *Biological Macromolecules*, New York, v.28, p. 359-363, 2001.
15. LAVERTU, M. et al. A validated 1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, New York , v.32, p.1149-1158, 2003.
16. ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Chitosan selfassembled thin-film: influence of solution concentration on film roughness and thickness. In: *SIMPOSIO LATINO AMERICANO DE POLÍMEROS, CONGRESO IBEROAMERICANO DE POLÍMERO,;SIMPOSIO IBEROAMERICANO DE QUITINA.; CONGRESO NACIONAL DE POLÍMEROS*, 2002.
17. ASSIS, O.B.G; ALVES, H.C. Metodologia mínima para a produção de filmes comestíveis de quitosana e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas. Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP . *Comunicado Técnico* - Embrapa. n. 49, 5p , 2002.
18. ASSIS, O. B. G.; VIEIRA, D. C.; BERNARDES-FILHO, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. AFM. Characterization of chitosan self-assembled films. *International Journal of Polymeric Materials*, v. 51, n. 7, p. 633-638, 2002(c).