



RIBADOURO

NanoKeyWater

Extração de nanoquitina a partir do exoesqueleto de *Procambarus clarkii* e sua aplicação na desinfecção de água



Inês A. Teixeira e Leonor R. E. Silva

Professora: Elsa C. S. Oliveira

RIBADOURO

Consultores Científicos

Luís Pinto da Silva
(Faculdade de Ciências, Universidade do Porto)

Pedro M. S. M. Rodrigues
(Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico da Guarda)

Concurso Nacional para Jovens Cientistas e Investigadores

Porto, Portugal
2025

Índice

Sumário

Abstract

1. Introdução

- 1.1 – Desinfecção da água
- 1.2 – Nanoquitina
- 1.3 – Lagostim-vermelho-do-louisiana (*Procambarus clarkii*)
- 1.4 – Objetivo deste projeto

2. Material e métodos

- 2.1 – Reagentes e amostras de exoesqueletos de camarão e lagostim
- 2.2 – Extração da quitina
- 2.3 – Preparação da nanoquitina
- 2.4 – Análises físico-químicas
- 2.5 – Análise microbiológica

3 - Resultados

4 - Discussão

5 - Conclusão

Agradecimentos

Referências bibliográficas

Sumário

A necessidade de métodos eficazes e sustentáveis para a desinfecção da água impulsionou a investigação sobre nanomateriais com propriedades antimicrobianas. Foram extraídas nanoquitinas de exoesqueletos de camarão e de lagostim-vermelho-do-Louisiana (*Procambarus clarkii*), correspondentes a resíduos provenientes da indústria alimentar, para serem utilizadas como material desinfetante de água contaminada microbiologicamente. Após serem transformadas em pó, os exoesqueletos foram desproteinizadas e desmineralizadas para se obter a respectiva quitina, seguindo-se o procedimento de hidrólise com uma solução aquosa de ácido clorídrico a 3,0 mol/L. Os materiais/nanomateriais obtidos foram caracterizados por infravermelho, dispersão de tamanhos e de cargas, microscopia eletrônica de varrimento e por espectroscopia de raios X por dispersão em energia. As nanoquitinas são nanomateriais fibrosos com um comprimento de algumas centenas de nanômetros e com um diâmetro de algumas dezenas de nanômetros. As culturas microbiológicas demonstraram capacidade antimicrobiana da nanoquitina obtida a partir do exoesqueleto de lagostim, reduzindo a carga microbiana. Estes dados sugerem que a nanoquitina pode ser uma alternativa promissora e ecológica aos desinfetantes convencionais, contribuindo para a melhoria dos processos de tratamento de água.

Palavras-chave: Nanoquitina; desinfecção da água; lagostim-vermelho-do-Louisiana.

Abstract

The need for effective and sustainable methods for water disinfection has driven research into nanomaterials with antimicrobial properties. Nanochitins were extracted from shrimp and Louisiana Red Crayfish (*Procambarus clarkii*) shells, waste from the food industry, to be used as a disinfectant material for microbiologically contaminated water. After being transformed into powder, the shells were deproteinized and demineralized to obtain the respective chitin, followed by the hydrolysis procedure with an aqueous solution of 3.0 mol/L hydrochloric acid. The materials/nanomaterials obtained were characterized by infrared, size, charge dispersion, scanning electron microscopy, and energy dispersive spectroscopy. Nanochitins are fibrous nanomaterials with a length of a few hundred nanometers with a diameter of a few tens of nanometers. Microbiological cultures demonstrated the antimicrobial capacity of nanochitin obtained from crayfish shells, reducing the microbial load. These data suggest that nanochitin may be a promising and environmentally friendly alternative to conventional disinfectants, contributing to the improvement of water treatment processes.

Keywords: Nanochitin; water disinfection; Louisiana Red Crayfish.

1 - Introdução

1.1 – Desinfecção da água

A água é essencial a toda a vida da Terra. No entanto, quando contaminada com microrganismos patogénicos ou substâncias químicas tóxicas, pode tornar-se uma fonte de doenças. O tratamento da contaminação microbiológica da água destinada ao consumo humano, vulgarmente designada por desinfecção, começou no início do século XX com o uso de cloro como agente desinfetante [1]. Graças a este avanço, o número de doenças com origem hídrica como, por exemplo, a febre tifoide e a cólera, diminuiu significativamente, sendo a desinfecção reconhecida como um dos principais fatores que contribuiu para o aumento da esperança média de vida no último século [1,2]. Contudo, a utilização de desinfetantes tradicionais como o cloro pode ter um efeito não desejado na qualidade final da água: a formação de subprodutos da desinfecção da água (SDA) como, por exemplo, os trihalometanos (THM) [1-3]. Alguns destes SDA são tóxicos e cancerígenos, representando um risco para a saúde humana [3].

Uma das possíveis estratégias para mitigar este problema consiste na substituição parcial ou total dos agentes desinfetantes à base de cloro por outros que têm igualmente propriedades desinfetantes e que simultaneamente sejam mais seguros. Neste contexto, propõe-se neste projeto, como hipótese de trabalho, a utilização de nanoquitina na desinfecção da água. Este nanomaterial, obtido por hidrólise da quitina, destaca-se por ser um material natural, não tóxico, biocompatível, com atividade antimicrobiana [4], e pelo facto de poder ser extraído de uma espécie invasora, como é o caso do lagostim-vermelho-do-Louisiana, o que constitui um benefício ecológico adicional.

1.2 – Nanoquitina

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na Terra, superado apenas pela celulose, e é produzido por crustáceos, moluscos, insetos e alguns fungos, com uma produção anual estimada de cerca de 100 mil milhões de toneladas [5-8]. A quitina é o principal componente das paredes celulares dos fungos e dos exoesqueletos dos crustáceos e insetos, e tem um papel essencial na reprodução, crescimento e desenvolvimento destes organismos [8]. Anualmente, a indústria alimentar gera entre 6 a 8 milhões de toneladas de resíduos de cascas de crustáceos (caranguejos, camarões e lagostas) [5]. A maior parte destes resíduos não são reciclados, embora eles contenham substâncias químicas úteis, como proteínas, carbonato de cálcio e quitina [5-7].

Sujeitando a quitina a hidrólise ácida provoca a quebra aleatória de regiões não cristalinas produzindo uma suspensão coloidal estável de nanopartículas, que se denomina de nanoquitina [10-12]. A quebra da estrutura da quitina em frações de dimensão nanométrica preserva a sua reatividade, mas aumenta a sua solubilidade/dispersibilidade em água [12]. Assim, a nanoquitina apresenta um conjunto de propriedades distintivas como, por exemplo: o pequeno tamanho, solubilidade em água, baixa densidade, área superficial elevada, maior reatividade química, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antioxidante, propriedade antimicrobiana e excelentes características mecânicas [10]. Estas características tornam a nanoquitina num material promissor para aplicação em diversas áreas, nomeadamente na desinfecção de água

1.3 – Lagostim-vermelho-do-Louisiana

O lagostim-vermelho-do-Louisiana, de nome científico *Procambarus clarkii* (*P. clarkii*), também conhecido como lagostim de água doce (Fig. 1), é uma espécie de crustáceo com ampla distribuição geográfica, a nível mundial. Esta espécie apresenta um exoesqueleto duro, de coloração avermelhada, e o corpo dividido em duas regiões principais – cefalotórax e abdómen. No cefalotórax estão presentes duas pinças bem pronunciadas, um par de antenas e um conjunto de 8 patas e no seu abdómen segmentado existe um pequeno télson (parte terminal do abdómen) que comunica com uropódios (estruturas laterais em forma de leque) [13]. Este crustáceo é uma espécie omnívora, ou seja, alimenta-se de matéria animal e vegetal viva ou morta, dando preferência a carne fresca quando esta está disponível [14].

Esta espécie é nativa do nordeste do México e do centro e sul dos EUA e foi introduzida intencionalmente em diversas regiões do planeta para aquacultura, tendo escapado para ecossistemas naturais, onde se tornou numa espécie invasora. Em Portugal, esta espécie surgiu em 1979 e encontra-se atualmente disseminada por, pelo menos, 11 bacias hidrográficas, constituindo uma verdadeira praga nos ecossistemas aquáticos de água doce, competindo e eliminando diversas espécies autóctones que são, sobretudo, utilizadas como seu alimento, promovendo, assim, a perda de biodiversidade e a alteração dos ecossistemas aquáticos



Figura 1 - Vista lateral de lagostim-vermelho-do-Louisiana, *Procambarus clarkii*.

1.4 – Objetivos

O objetivo deste projeto é desenvolver um procedimento de desinfecção da água que possa evitar ou pelo menos minimizar a produção de SDA de modo a salvaguardar a saúde humana. Por outro lado, este projeto está alinhado com os princípios da economia circular porque serão usados resíduos da indústria alimentar para a extração do material desinfetante, nomeadamente a reciclagem dos exoesqueletos de camarões e lagostins. Também, com este projeto pretende-se utilizar uma espécie de lagostim classificada como invasora em diversas áreas geográficas, o lagostim-vermelho-do-Louisiana (*Procambarus clarkii*), contribuindo para a sensibilização ambiental relativamente a este tipo de problema, e promovendo, assim, a sua valorização.

2 - Material e métodos

2.1 – Reagentes e amostras de exoesqueletos de camarão e lagostim

Todos os reagentes usados neste trabalho foram de qualidade analítica. Os exoesqueletos de camarão foram obtidas numa peixaria, onde constituem um bioresíduo. Os exoesqueletos de lagostim foram obtidas a partir de resíduos sólidos domésticos, uma vez que esta espécie começa a ser comercializada como alimento humano no nosso país.

2.2 – Extração da quitina

Os exoesqueletos de camarão e de lagostim foram lavadas com água desionizada e secas a 70 °C durante pelo menos 24 h e, de seguida, foram pulverizadas num moinho de bolas. A desproteinização e desmineralização das cascas em pó foi efetuada com soluções de hidróxido de sódio 1,0 mol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L, respetivamente [15]. Posteriormente, foram adicionadas 20 g de exoesqueleto em pó a 500 mL de hidróxido de sódio e mantidas em agitação a temperatura ambiente durante 24 h. O pó em suspensão foi recolhido por centrifugação durante 15 min a 6000 rpm e disperso em 500 mL de ácido clorídrico, mantendo em agitação a temperatura ambiente durante 24 h. Após centrifugação durante 15 min a 6000 rpm os procedimentos de desproteinização e desmineralização foram repetidos de forma sequencial. A quitina purificada foi recolhida por centrifugação e lavada com água desionizada até pH neutro. A suspensão da quitina em água desionizada foi seca na estufa a 70 °C durante 48 h.

2.3 – Preparação da nanoquitina

A nanoquitina foi obtida de acordo com o procedimento de hidrólise descrito em [16]. Nomeadamente, colocou-se 1,0 g de quitina purificada (secção 2.2) num balão de fundo redondo de 500 mL. Adicionou-se 300 mL de uma solução de ácido clorídrico 3,0 mol/L, uma barra magnética, uma sonda de temperatura e adaptou-se ao balão um condensador. Aqueceu-se, com agitação, durante 90 min a 90 °C. O produto resultante foi recolhido por centrifugação durante 15 min a 6000 rpm. Repetiu-se este procedimento por mais 2 vezes utilizando o sólido recolhido na centrifugação anterior e uma nova quantidade de ácido clorídrico 3,0 mol/L.

O produto final foi dialisado contra água desionizada numa membrana de diálise com um *cut-off* de 1000 Da (Float-A-Lyzer®G2 Dialysis Device SPECTRUM®, New Brunswick, NJ, USA) para remover o ácido. O sólido purificado foi transferido para um recipiente e liofilizado.

2.4 – Análises físico-químicas

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram medidos com um espectrómetro Perkin-Elmer (Waltham, MA, EUA, EUA) Spectrum Two com um acessório de amostragem ATR. O diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta foram medidos utilizando um analisador de partículas

Anton Paar LitesizerTM 500 (Graz, Áustria) e uma cuvete de policarbonato (Ref. 155765) (Graz, Áustria). A morfologia e a composição química das nanoquitinas foram obtidas por microscopia eletrónica de varrimento e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (*“Energy Dispersive Spectroscopy - EDS”*) (Quanta 200 da FEI Company, Hillsboro, OR, EUA).

2.5 – Análise microbiológica

Para avaliar o potencial desinfetante das nanoquitinas extraídas dos exoesqueletos de camarão e lagostim, foram realizadas culturas microbiológicas utilizando uma amostra de água de fontanário não controlado e amostras da mesma água tratadas com nanoquitinas. Foi estabelecido um grupo controle (amostra sem tratamento) e dois brancos, compostos por água esterilizada tratada com nanoquitina de camarão e lagostim, respetivamente.

O meio de cultura utilizado foi o Plate Count Agar (PCA), preparado com 24 g do meio dissolvido em um litro de água desionizada, seguido de esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para os brancos, foram utilizados frascos com 20 mL de água destilada, aos quais, após esterilização, foram adicionados aproximadamente 0,3 g de nanoquitina (camarão e lagostim). Para o tratamento da amostra de água, foram preparados dois frascos esterilizados com 20 mL de amostra, sendo um tratado com 0,4 g de nanoquitina de camarão e outro com 0,3 g de nanoquitina de lagostim. Após a adição da nanoquitina, as amostras e os brancos foram agitados e deixados em contacto por cerca de 40 minutos. Após esse período, foi realizada a inoculação de 1 mL de cada amostra e branco em placas de Petri, seguida da adição de PCA pela técnica de inundação. Procedeu-se então à mistura lenta para homogeneizar a amostra e o meio. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 22°C por 72 horas e a 37°C por 48 horas, simulando condições ambientais e corporais, respetivamente. Após a incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colónias (UFC/mL). Cada ensaio foi conduzido em triplicado para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, foram incubadas placas contendo apenas o meio de cultura para controlo da qualidade do meio e verificação da eficácia do procedimento de esterilização.

3 - Resultados

Os materiais obtidos a partir dos exoesqueletos do camarão e do lagostim (cascas, quitina e nanoquitina) foram analisados por espectroscopia de infravermelho e os respetivos espectros de infravermelho (IV) são apresentados na Fig. 2. Os espectros de IV mostram que os exoesqueletos de camarão (Fig. 2.a) e de lagostim (Fig. 2.b) são marcadamente diferentes das correspondentes amostras de quitina e nanoquitina. Esta diferença deve-se à presença de proteínas e carbonato de cálcio nos exoesqueletos. A presença de carbonato de cálcio é particularmente observada no espectro de IV da casca de lagostim (Fig. 2.b), pelas bandas de IV a 716, 869 e 1420 cm^{-1} , o que sugere uma maior concentração deste constituinte, confirmando a observação de que os exoesqueletos dos lagostins são muito mais rígidos do que as do camarão.

Os espectros de IV das amostras de quitina e nanoquitina extraídas do exoesqueleto do camarão e lagostim são semelhantes. Dos seus espectros de IV destacam-se as bandas a 1620 e 1656 cm^{-1} que correspondem à vibração do grupo funcional carbonilo (C=O) nos grupos amida, e as bandas a 3105 e 3260 cm^{-1} que correspondem a deformação de ligações N-H. Estas bandas de IV mostram que a quitina extraída do camarão e do lagostim tem uma estrutura polimórfica de α -quitina [15].

As nanoquitinas de camarão e lagostim foram dispersas em água, originando suspensões suficientemente estáveis para serem efetuadas medições por DLS (*“Dynamic Light Scattering”*) da sua dispersão de tamanhos e carga. Na Fig. 3 são apresentados as distribuições dos tamanhos (Fig. 3.a) e das cargas (Fig. 3.b) das duas nanoquitinas. A análise das Fig. 3.a mostra que a nanoquitina de lagostim apresenta uma distribuição de tamanhos mais homogénea, com um valor médio de tamanho de 291 nm. No caso da amostra de nanoquitina da casca de camarão, a sua distribuição de tamanhos está dispersa até valores superiores a 2 μm e apresenta um valor médio de 581 nm – esta distribuição tem dois máximos, um a 0,17 μm e outro a 0,92 μm . As cargas das duas amostras de nanoquitina (Fig. 3.b) são semelhantes com uma carga de 37,9 e 39,3 mV para as nanoquitinas de camarão e lagostim, respetivamente.

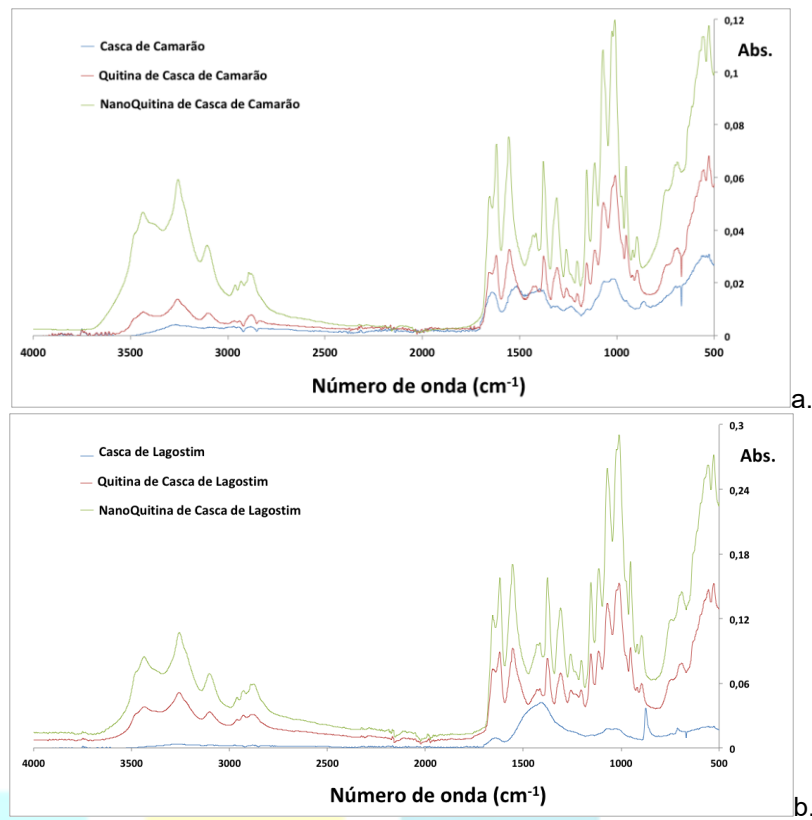


Figura 2 – Espectros de IV dos materiais extraídos das cascas do camarão (a) e lagostim (b).

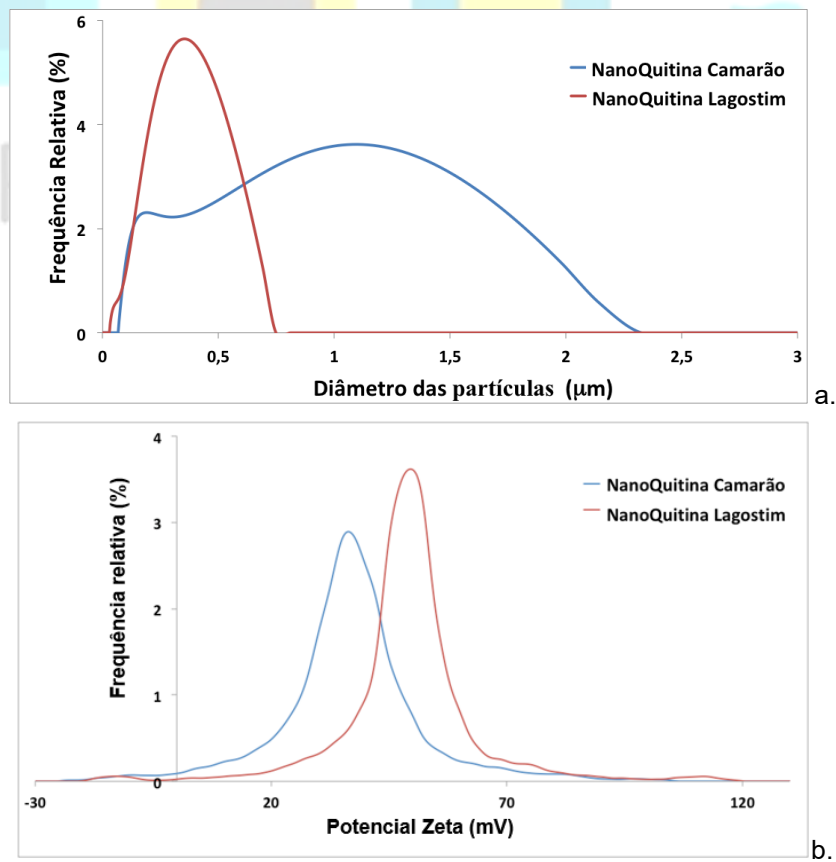


Figura 3 – Distribuição do tamanho (diâmetro hidrodinâmico) (a) e potencial Zeta (b) das nanoquitinas de camarão e lagostim.

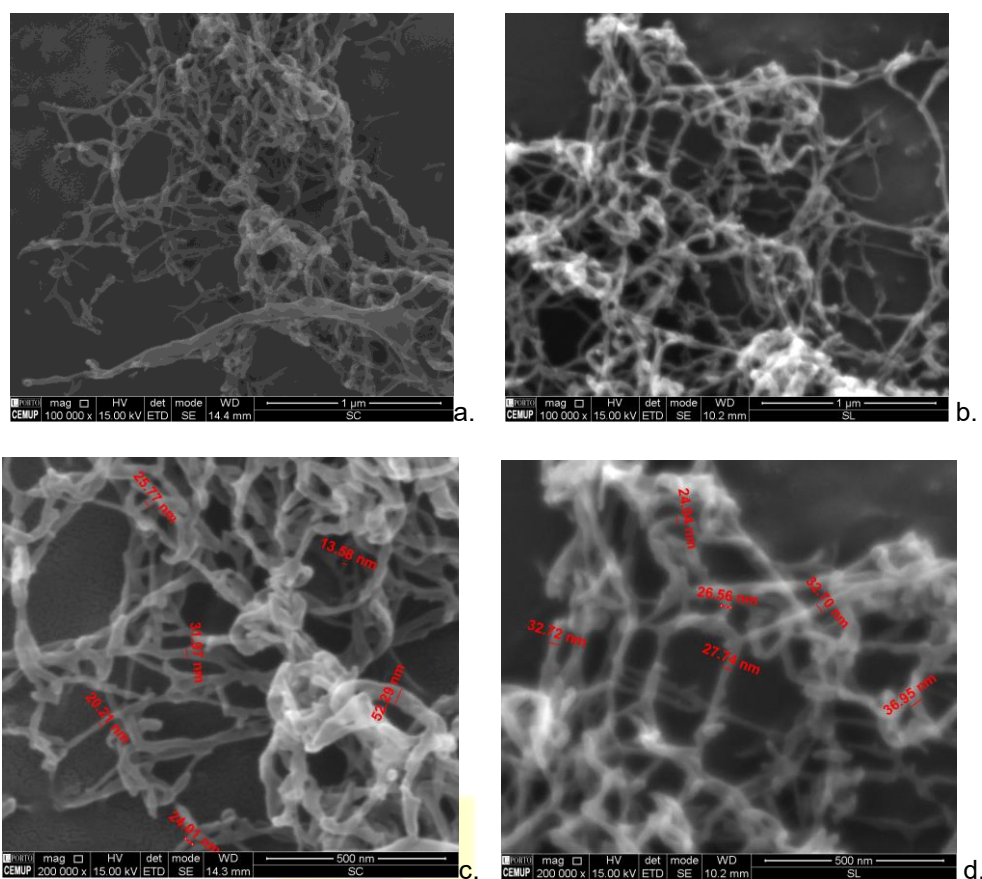


Figura 4 – Imagens de microscopia eletrônica de varrimento das nanoquitinas de camarão (a,c) e lagostim (b,d).

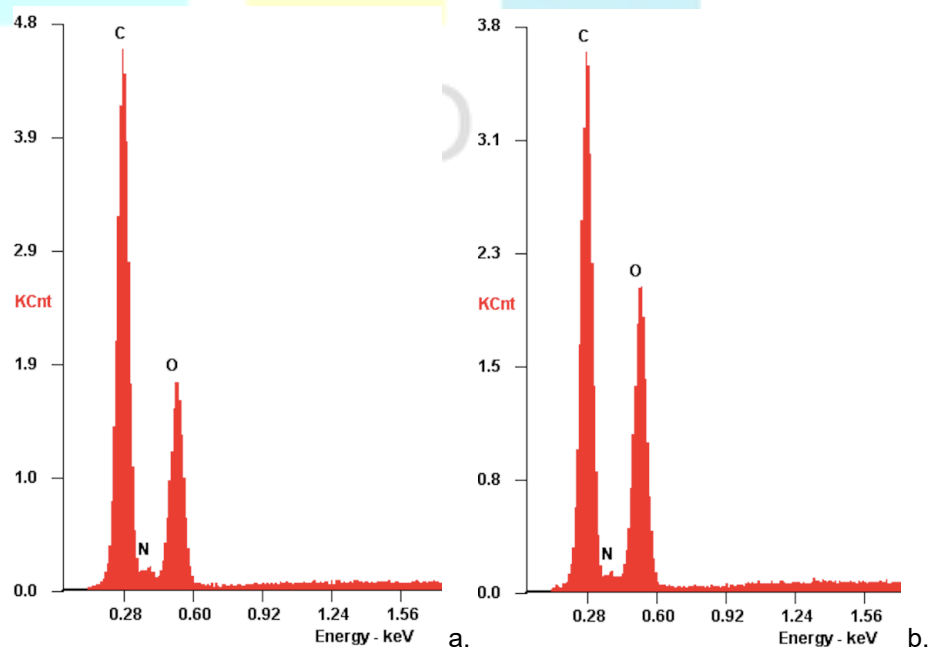


Figura 5 – Espectros de raios X por dispersão em energia (EDS) das nanoquitinas de camarão (a) e lagostim (b).

Macroscopicamente as amostras de nanoquitina apresentam um aspeto semelhante ao do algodão. A sua observação ao microscópio eletrónico de varrimento (Fig. 4) mostra que as nanoquitinas sólidas são fibras, com um diâmetro de algumas dezenas de nanómetros, maioritariamente entre os 10 e os 30 nm (Fig. 4.c,d), com elevada tendência para se agregarem. Não se observam diferenças claras entre as nanoquitinas obtidas a partir dos exoesqueletos de camarão e lagostim. A composição química das

nanoquitinas foi também analisada por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) (Fig. 5). Foram identificados os mesmos elementos para as duas nanoquitinas, sendo constituídas maioritariamente por C e O, verificando também a presença de N. No entanto, o rácio C/O é menor para a nanoquitina de lagostim, indicando uma maior oxigenação da mesma.

O potencial de desinfeção das nanoquitinas foi medido por contagem dos microrganismos viáveis após incubação a 22 °C e 37 °C (Tabela 1). A análise da Tabela 1 mostra que a nanoquitina obtida do exoesqueleto do lagostim apresenta um potencial de desinfeção da amostra de água, uma vez que não foram detetados microrganismos viáveis nas respetivas culturas. No entanto, não se verificou o mesmo para a nanoquitina obtida da casca do camarão. Neste caso, mesmo no branco verifica-se crescimento a 22 °C e a 37°C, o que indica que apesar de serem semelhantes em termos de morfologia e composição, as duas nanoquitinas apresentam um potencial desinfetante bastante diferente entre si.

Tabela 1 – Microrganismos viáveis (UFC/mL) (média de 3 ensaios independentes com o desvio padrão entre parênteses).

Amostra	22 °C	37 °C
Branco:		
Nanoquitina camarão	6,7(1,1)	5,7(1,2)
Nanoquitina lagostim	0(0)	0,3(0,6)
Amostra de água contaminada	1,0(1,0)	0,3(0,6)
Ensaio (amostra de água contaminada com 50 mg de nanoquitina):		
Nanoquitina camarão	6,7(1,1)	5,5(3,5)
Nanoquitina lagostim	0(0)	0(0)

4 - Discussão

Os resultados demonstraram que a nanoquitina extraída do lagostim-vermelho-do-Louisiana (*Procambarus clarkii*) apresenta um potencial efeito desinfetante. Pelo contrário a nanoquitina extraída do camarão tem um efeito negativo na qualidade microbiológica, como fica patente pelo crescimento existente mesmo nas incubações com os brancos, a 22°C e 37°C (Tabela 1). Esta diferença entre as duas nanoquitinas é algo surpreendente, pois os dois tipos de nanopartículas parecem ser constituídos pelos mesmos tipos de grupos funcionais (espectros IV semelhantes, Fig. 2) e ter a mesma morfologia (Fig. 4).

Nanopartículas catiónicas têm um elevado potencial para a desinfeção de água, já que muitos microrganismos apresentam uma carga superficial negativa [17]. Como tal, as nanopartículas catiónicas são atraídas electrostaticamente para estes microrganismos, aumentando a sua interação com a superfície dos microrganismos, levando à sua disrupção e consequente morte celular. As duas nanoquitinas produzidas neste projeto possuem um potencial zeta médio positivo, e semelhante entre si (Fig. 3), o que permitiria esperar que ambas tivessem potencial desinfetante. Isto foi confirmado por ensaios microbiológicos (Tabela 1), mas apenas para a nanoquitina obtida a partir do lagostim. Como tal, pode-se concluir que uma carga superficial positiva é importante para se obter atividade desinfetante, explicando-se assim os resultados para a nanoquitina extraída do lagostim. No entanto, existirão outros fatores que levam a uma atividade desinfetante, e que não se verificarão para a nanoquitina extraída do camarão.

Uma diferença relevante entre as nanoquitinas são os seus diferentes diâmetros hidrodinâmicos e distribuição de tamanhos (Fig. 3), que indicam que a nanoquitina de camarão tem mais tendência para agregação em solução. Isto reduz a superfície reativa das nanopartículas disponível para interagir com os microrganismos, enquanto reduz a sua estabilidade em solução [18,19]. Pelo contrário, a nanoquitina de lagostim parece permanecer mais dispersa em solução, aumentando a sua estabilidade e capacidade de interação com os microrganismos [19]. Desta forma, apesar de potenciais zeta semelhantes, a nanoquitina de lagostim parece ter mais capacidade de interação com os microrganismos, levando à disrupção da superfície e morte celular.

A diferença entre a dispersão e estabilidade das duas nanoquitinas terá a ver com as suas diferentes composições químicas. Isto é, o menor rácio C/O da nanoquitina de lagostim indica que terá um maior grau de oxidação, potencialmente com a formação de maior número de grupos hidroxilo à sua superfície, o que é compatível com os resultados obtidos por IV (Fig. 2) e EDS (Fig. 5). Como grupos hidroxilo podem atuar como grupos dadores e aceitadores de pontes de hidrogénio, podem aumentar a hidrofiliidade desta nanoquitina, e formar pontes de hidrogénio com moléculas de água. Estas interações podem criar camadas

de hidratação, impedindo a agregação entre nanopartículas, e promovendo uma dispersão mais uniforme das mesmas em soluções aquosas. O aumento de grupos hidroxilo à superfície também poderá aumentar a interação das nanopartículas com moléculas biológicas, potencialmente favorecendo a adesão a microrganismos.

Desta forma, os resultados indicam que o melhor desempenho da nanoquitina extraída do lagostim-vermelho-do-Louisiana pode estar relacionado com a sua maior homogeneidade no tamanho das partículas e a sua elevada área superficial, que favorece a interação com os microrganismos. Ou seja, o menor tamanho da nanoquitina de lagostim pode favorecer uma interação mais eficiente com as superfícies bacterianas, inativando-as.

5 - Conclusão

Os resultados obtidos confirmam o potencial da nanoquitina extraída do lagostim como um agente desinfetante eficaz, capaz de reduzir a presença de microrganismos na água sem gerar subprodutos tóxicos da desinfecção. O potencial antimicrobiano observado, aliado ao seu perfil ecológico e biodegradável, destaca a nanoquitina como uma alternativa sustentável aos desinfetantes tradicionais. Além do mais a metodologia desenvolvida permite a valorização de resíduos da indústria alimentar, contribuindo para a sustentabilidade ambiental e a economia circular. Contudo, estudos adicionais são necessários para validar os resultados preliminares obtidos. Assim, estudos adicionais para avaliar a sua aplicação a larga escala e possíveis efeitos a longo prazo são necessários. Além do mais são também necessários trabalhos adicionais para otimizar a dose de nanoquitina necessária para a desinfecção, bem como estudar os tempos de contacto necessários para tornar a desinfecção mais eficaz.

Agradecimentos

Agradecemos à nossa Professora Elsa Oliveira, da disciplina de Biologia e Geologia, do Colégio Ribadouro, por nos ter proposto este tema de investigação e nos ter apoiado no desenvolvimento deste projeto. Também, agradecemos o apoio que o Colégio Ribadouro nos tem dado para a elaboração deste trabalho de investigação.

Muito importante foi também o apoio do Centro de Investigação em Química da Universidade do Porto (CIQ-UP), por nos ter permitido realizar parte das atividades experimentais nos seus laboratórios e utilizado os seus equipamentos, em particular ao Professor Luís Pinto da Silva. Também, agradece-se ao Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelas facilidades na utilização dos seus laboratórios. Também, fundamental para este projeto, foi o apoio do Professor Pedro Rodrigues, da Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico da Guarda, na realização das atividades experimentais associadas às análises microbiológicas.

Referências bibliográficas

- [1] A.N. Angelakis, H.S. Vuorinen, C. Nikolaidis, P.S. Juuti, T.S. Katko, R.P. Juuti, J. Zhang, G. Samonis, Water Quality and Life Expectancy: Parallel Courses in Time. Water 2021, 13, 752. <https://doi.org/10.3390/w13060752>
- [2] B.N. Anderson, G.P. Black, T.M. Young, Disinfection Byproducts in Drinking Water from the Tap: Variability in Household Calculated Additive Toxicity (CAT), ACS EST Water 2024, 4, 3532. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.4c00392>
- [3] I. Evlampidou *et al*, Trihalomethanes in Drinking Water and Bladder Cancer Burden in the European Union, Environmental Health Perspectives 2020, 128, 017001-1. <https://doi.org/10.1289/EHP4495>
- [4] R. Jayakumara, D. Menona, K. Manzoora, S.V. Naira, H. Tamur, Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review, Carbohydrate Polymers 2010, 82, 227. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.074>
- [5] N. Yan, X. Chen, Sustainability: don't waste seafood waste, Nature 2015, 524, 155.
- [6] J. Hou, B.E. Aydemir, A.G. Dumanli, Understanding the structural diversity of chitins as a versatile biomaterial, Philosophical Transactions Royal Society A 2021, 379: 20200331. <https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0331>
- [7] U. Dave, E. Somanader, P. Baharlouei, L. Pham, M.A. Rahman, Applications of Chitin in Medical, Environmental, and Agricultural Industries, Journal of Marine Science and Engineering 2021, 9, 1173. <https://doi.org/10.3390/jmse9111173>

- [8] D.D. Chen, Z.B. Wang, L.X. Wang, P. Zhao, C.H. Yun, L. Bai, Structure, catalysis, chitin transport, and selective inhibition of chitin synthase, *Nature Communications* 2023, 14, 4776. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40479-4>
- [9] L. Serventia, Q. He, J. Huang, A. Mania, A.J. Subhash, Advances in the preparations and applications of nanochitins, *Food Hydrocolloids for Health* 2021, 1, 100036. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100036>
- [10] S. Ngasotter, L. Sampath, K.A. Xavier, Nanochitin: An update review on advances in preparation methods and food applications, *Carbohydrate Polymers* 2022, 291, 119627. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119627>
- [11] S. Lee, L.T. Hao, J. Park, D.X. Oh, D.S. Hwang, Nanochitin and Nanochitosan: Chitin Nanostructure Engineering with Multiscale Properties for Biomedical and Environmental Applications, *Advanced Materials* 2023, 35, 2203325. <https://doi.org/10.1002/adma.202203325>
- [12] P.L. Chee, T. Sathasivam, Y.C. Tan, W. Wu, Y. Leow, Q.R. Lim, P.Y. Yew, Q. Zhu, D. Kai, Nanochitin for sustainable and advanced manufacturing, *Nanoscale* 2024, 16, 3269. <https://doi.org/10.1039/d3nr05533g>
- [13] P.M. Martins, V.M. Balcão, B.A. Nunes, Caracterização e valorização do lagostim *Procambarus clarkii*. Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN:1646-0499. 6, 2009, 110-122.
- [14] A.M. Correia, O. Ferreira, Burrowing behavior of the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Portugal, *Journal of Crustacean Biology* 1995, 15, 248. <https://doi.org/10.1163/193724095X00262>
- [15] S.P. Campana-Filho *et al*, Extração, estruturas e propriedades de α - e β - quitina. *Química Nova* 2007, 30, 644.
- [16] J.D. Goodrich, W.T. Winte, Alpha-Chitin Nanocrystals Prepared from Shrimp Shells and Their Specific Surface Area Measurement, *Biomacromolecules* 2007, 8, 252. <https://doi.org/10.1021/bm0603589>
- [17] Q. Wang, X. Liu, L. Zhang, Y. Lv, Microwave-assisted synthesis of carbon nanodots through an eggshell membrane and their fluorescent application. *Analyst* 2012, 137, 5392. <https://doi.org/10.1039/C2AN36059D>
- [18] S. Agnihotri, S. Mukherji, S. Mukherji, Impact of background water quality on disinfection performance and silver release of immobilized silver nanoparticles: Modeling disinfection kinetics, bactericidal mechanism and aggregation behavior, *Chemical Engineering Journal* 2019, 372, 684. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.186>
- [19] M. Riaz, V. Mutreja, S. Sareen, B. Ahmad, M. Faheem, N. Zahid, G. Jabbour, J. Park, Exceptional antibacterial and cytotoxic potency of monodisperse greener AgNPs prepared under optimized pH and temperature, *Scientific Reports* 2021, 11, 2866. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82555-z>