

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DE UM PROCESSO DE EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS  
CAROTENÓIDES PRESENTES NO RESÍDUO DA INDUSTRIALIZAÇÃO DO  
CAMARÃO-ROSA (*Farfantepenaeus paulensis*)**

**Engenheiro Químico ADILSON LUIS BERTOLO**

Dissertação apresentada para  
obtenção do título de Mestre em  
Engenharia e Ciência de Alimentos.

**PROF. DR. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ**  
Orientador

RIO GRANDE, RS  
2007

**APROVAÇÃO**

Dissertação defendida por ADILSON LUIS BERTOLO e aprovada em 20 de AGOSTO DE 2007, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

---

**PROF. DR. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ**

---

**PROF. DR<sup>A</sup>. MYRIAM SALAS MELLADO**

---

**PROF. DR. LUIS ANTÔNIO DE ALMEIDA PINTO**

---

**PROF. PhD. RUI CARLOS ZAMBIAZI**

Aos meus pais,  
Arno João Bertolo (*in memoriam*) e  
Maria Bertolo

Aos meus irmãos,  
Arlindo, Ademar, Neli e Roseli

Dedico.

“Deus, dai-me  
Serenidade para suportar  
as coisas que não posso mudar,  
Coragem para mudar as que posso e  
Sabedoria para saber distingui-las.”

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arno João Bertolo (*in memoriam*) e Maria Bertolo, aos irmãos Arlindo, Ademar, Neli e Roseli pela confiança, incentivo e compreensão da minha ausência e apoio para que eu pudesse buscar meus objetivos.

À Fundação Universidade Federal do Rio Grande, em especial ao Programa de Pós Graduação de Engenharia e Ciência de Alimentos, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández, pelo incentivo, confiança, ensinamentos e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Myriam Salas Mellado, por sua disponibilidade e atenção, dispensadas em todas as fases do projeto.

Ao pessoal técnico, os amigos: Inajara, Maria, Maria da Graça, Ana Sanzo, Maria de Jesus e Jacques, pelo apoio e atenção dispensados.

Ao corpo docente do Mestrado de Engenharia e Ciência de Alimentos, em especial aos professores Eliana Badiale Furlong, Ednei Primel, Janaína Burkert, Leonor Almeida de Souza Soares, Luis Antônio de Almeida Pinto pela solicitude e ensinamentos.

Ao Prof. Márcio Raimundo Milani, por fazer parte de minha formação profissional, pelo incentivo constante, conversas, conselhos, paciência, tolerância, amizade e carisma dedicados a mim ao longo de minha vida acadêmica.

Aos amigos Bruno Ladeira e Fernanda, companheiros no desenvolvimento deste trabalho, pela prontidão, dedicação e seriedade.

Ao laboratório de Tecnologia de Alimentos, e aos técnicos Maria de Jesus e Jacques Rizzi pela prontidão e disponibilização da estrutura laboratorial.

À empresa Cambará S. A e seu diretor industrial, Paulo Roberto Guimarães e ao diretor superintendente, Walter Rudi Christmann, pela flexibilidade que possibilitou a realização deste trabalho.

A todos os amigos da FURG que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os colegas de Mestrado, pela amizade, companheirismo e ajuda.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A minha namorada Valeska, pela paciência, amor, incentivo e imprescindível auxílio em todas as etapas deste trabalho.

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS _____	ix
LISTA DE TABELAS _____	xii
RESUMO _____	xiv
ABSTRACT _____	xv

### **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

1.1 INTRODUÇÃO _____	2
1.2 OBJETIVOS _____	4

### **CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA**

2.1 HISTÓRICO PESQUEIRO DA ZONA SUL DO RIO GRANDE DO SUL _____	6
2.2 CAMARÃO _____	7
2.2.1 Resíduo de Camarão _____	9
2.2.2 Composição Química dos Resíduos de Camarão _____	9
2.2.2.1 Componentes dos Resíduos _____	9
2.2.2.2 Composição Química dos Resíduos _____	10
2.2.2.3 Produtos Obtidos dos Resíduos de Camarão _____	11
2.3 CAROTENÓIDES _____	12
2.4 CAROTENOPROTEÍNA _____	15
2.5 ASTAXANTINA _____	16
2.6 MATÉRIAS-PRIMAS PARA OBTENÇÃO DA ASTAXANTINA _____	17
2.7 EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA _____	18
2.8 APLICAÇÕES DA ASTAXANTINA _____	20

### **CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS**

3.1. MATERIAL	23
3.1.1 Matéria-Prima	23
3.1.2 Infra-Estrutura	23
3.1.3 Reagentes e Enzimas	23
3.1.4 Equipamentos	23
3.2 METODOLOGIA	24
3.2.1 Metodologia Analítica	24
3.2.1.1 Caracterização da Matéria-Prima e do Produto Final	24
3.2.1.2 Quantificação da Astaxantina	24
3.2.1.3 Estudo da Estabilidade dos Carotenóides Frente à Luz e Temperatura	25
3.2.1.3.1 Estabilidade da oleoresina ao calor	25
3.2.1.3.2 Estabilidade da oleoresina à luz	26
3.2.2 Processamento	26
3.2.2.1 Processo de Obtenção da Carotenoproteína Através de Hidrólise Enzimática	26
3.2.2.2 Processo de Purificação da Carotenoproteína Através de Processo Químico	29

### **CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	33
4.2 OBTENÇÃO DA CAROTENOPROTEÍNA ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	33
4.2.1 Rendimento, composição em Proteína e Lipídios	33
4.2.1.1 Rendimento	35
4.2.1.2. Teor de Proteína	40
4.2.1.3 Lipídios	45
4.2.2 Processo de Purificação da Carotenoproteína Através de Processo Químico	51
4.2.3 Estudo da Estabilidade dos Carotenóides Frente à Luz e Temperatura	58
4.2.3.1 Estabilidade à Temperatura	58
4.2.3.2 Estabilidade à Luz	59

**CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO**

5.1 CONCLUSÃO \_\_\_\_\_ 62

**CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \_\_\_\_\_ 64



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA

Figura 2.1: Camarão-rosa ( <i>Farfantepenaeus paulensis</i> ). _____	8
Figura 2.2: Estrutura do licopeno. _____	14
Figura 2.3: Estrutura química da astaxantina. _____	16

### CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

Figura 3.1: Fluxograma utilizado para obtenção da carotenoproteína através do hidrolisado enzimático do resíduo de camarão-rosa ( <i>Farfantepenaeus paulensis</i> ). _____	27
Figura 3.2: Fluxograma utilizado para determinar as condições ótimas de extração dos carotenóides pelo processo químico. _____	30

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 4.1: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do rendimento. _____	36
Figura 4.2: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína. _____	37
Figura 4.3: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com o tempo de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína. _____	38
Figura 4.4: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com o tempo de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína. _____	38
Figura 4.5: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína. _____	39
Figura 4.6: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína. _____	39
Figura 4.7: Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura de hidrólise com o tempo de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína. _____	42

- Figura 4.8: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_42
- Figura 4.9: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com tempo de hidrólise em função do teor de proteína. \_\_\_\_\_43
- Figura 4.10: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com o tempo de hidrólise em função do teor de proteína. \_\_\_\_\_43
- Figura 4.11: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com temperatura de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_44
- Figura 4.12: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_44
- Figura 4.13: Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura de hidrólise com o tempo de hidrólise em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_47
- Figura 4.14: Diagrama de contorno do efeito combinado tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_47
- Figura 4.15: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de hidrólise com a concentração de enzima e substrato em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_48
- Figura 4.16: Diagrama de contorno do efeito combinado tempo de hidrólise com a concentração de enzima e substrato em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_48
- Figura 4.17: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_49
- Figura 4.18: Diagrama de contorno do efeito combinado temperatura de hidrólise com a concentração de enzima e substrato em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína. \_\_\_\_\_50
- Figura 4.19: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de extração com a temperatura de extração química em função da concentração de astaxantina. \_54
- Figura 4.20: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de extração com a temperatura de extração química em função da concentração de astaxantina. \_54

- Figura 4.21: Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína. \_\_\_\_\_55
- Figura 4.22: Diagrama de contorno do efeito combinado da temperatura de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína. \_\_\_\_\_55
- Figura 4.23: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína. \_\_\_\_\_56
- Figura 4.24: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína. \_\_\_\_\_56
- Figura 4.25: Curva de degradação da oleoresina de astaxantina a 105°C. \_\_\_\_\_58
- Figura 4.26: Teste de estabilidade (luz e escuro) da oleoresina. \_\_\_\_\_60

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 2.1: Composição química percentual de resíduos de camarão frescos. \_10

### CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3.1: Matriz do planejamento experimental  $2^3$  utilizando enzima Flavourzyme para obtenção da carotenoproteína através de hidrólise enzimática\_\_\_\_\_28

Tabela 3.2: Matriz do planejamento experimental  $2^3$  completo.\_\_\_\_\_31

### CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.1: Composição proximal dos resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). \_\_\_\_\_33

Tabela 4.2: Respostas apresentadas pelo rendimento, teor de proteínas e lipídios obtidos a partir da enzima Flavourzyme utilizando a matriz  $2^3$  \_\_\_\_\_34

Tabela 4.3: Efeito estimado para o rendimento do processamento do resíduo do camarão-rosa processado com a enzima Flavourzyme. \_\_\_\_\_35

Tabela 4.4: Análise de variância para a variável rendimento\_\_\_\_\_35

Tabela 4.5: Efeitos estimados para o teor de proteína dos hidrolisados protéicos do resíduo do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) processados com a enzima Flavourzyme. \_\_\_\_\_40

Tabela 4.6: Análise de variância para o teor de proteína. \_\_\_\_\_41

Tabela 4.7: Efeitos estimados para o teor de lipídios dos hidrolisados protéicos provenientes dos resíduos do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) processados com a enzima Flavourzyme. \_\_\_\_\_45

Tabela 4.8: Análise de variância para o teor de lipídios presentes na carotenoproteína. \_\_\_\_\_46

Tabela 4.9: Respostas apresentadas pela concentração de astaxantina utilizando a matriz  $2^3$  a 95% de significância para as variáveis temperatura, tempo de extração química e proporção hexano/acetona. \_\_\_\_\_51

Tabela 4.10: Efeitos estimados para a variável resposta, concentração de astaxantina presente na oleoresina. \_\_\_\_\_52

Tabela 4.11: Análise de variância para o planejamento fatorial completo  $2^3$  da extração química da Astaxantina proveniente de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). \_\_\_\_\_53

Tabela 4.12: Análise do efeito do calor sobre a oleoresina de astaxantina. \_\_\_\_58

Tabela 4.13: Valores de absorvância obtidas para análise do efeito da luz sobre a oleoresina contendo astaxantina proveniente de resíduos de camarão-rosa. \_\_\_\_59

Tabela 4.14: Constantes de velocidade de reação (K) e tempo de meia-vida para o estudo da estabilidade frente à luz. \_\_\_\_\_60

## RESUMO

A astaxantina é um carotenóide da classe das xantofilas, amplamente distribuída em animais marinhos e aquáticos, sendo muito utilizada em formulações para aqüicultura e por suas propriedades antioxidantes, podendo também ser utilizada como corante alimentício por sua coloração avermelhada. Este carotenóide pode ser extraído de algas, bactérias e também de crustáceos como o camarão-rosa. Este crustáceo é amplamente capturado na região sul do Rio Grande do Sul, sendo que seu processamento gera mais de 60% de resíduos. O aproveitamento destes resíduos surge como uma alternativa a problemas de impacto ambiental, oriundos do seu despejo na lagoa dos Patos, bem como uma fonte alternativa de recursos para as indústrias e pescadores locais. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de carotenoproteína, utilizando resíduos provenientes da industrialização do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) por meio de hidrólise enzimática com adição da enzima proteolítica Flavourzyme, e a partir dela, a purificação química da astaxantina, visando avaliar quais variáveis do processo possuíam efeito significativo, e depois de obtido o extrato, foi estudada sua estabilidade frente à luz e temperatura, utilizando astaxantina dissolvida em óleo de soja, como oleoresina. Para analisar quais as variáveis que realmente influenciam no processo de obtenção da carotenoproteína, optou-se pela utilização do planejamento experimental saturado  $2^3$  com três pontos centrais, onde se têm três variáveis independentes em dois níveis: tempo (2 e 3 h), temperatura (40 e 50°C) e concentração de enzima/substrato (0,1 e 0,3%); e como variáveis dependentes: rendimento, porcentagem de proteína e de lipídios. As condições ótimas para o processamento foram: tempo de hidrólise de 2 horas, temperatura de hidrólise de 50°C e concentração de Enzima/Substrato de 0,3%, obtendo um rendimento do processo 9,4% , um teor de proteínas de 70,9% e teor de lipídios de 1,6%. Já para o processo de purificação química da carotenoproteína também foi utilizado um planejamento experimental quadrático completo do tipo  $2^3$ , com três variáveis independentes em dois níveis, sendo elas: tempo de extração (80 e 280 min), temperatura de extração (26,6 e 43,4°C) e proporção de hexano/ acetona (8 e 92%) e como variáveis dependentes a concentração de astaxantina com três pontos centrais e dois axiais, sendo que com um tempo de extração química de 120 min, temperatura de extração de 30 °C e com uma proporção de Hexano e Acetona de 25% foi obtida a maior concentração de astaxantina que foi de 197,41 ppm.

Finalmente foi estudada a estabilidade da oleoresina frente ao calor, apresentando-se estável durante as 8 primeiras horas de exposição à temperatura de 105°C. Já na estabilidade frente à luz, a oleoresina mostrou-se estável por um período de 7 dias.

Palavras-chave: Carotenoproteína, hidrólise enzimática, purificação química, astaxantina.

### ABSTRACT

The Astaxanthin is a carotenoid of the xanthophylls class, widely distributed in marine and aquatic animals, and is often used in formulations for aquaculture and for their antioxidant properties and may also be used as food coloring on its reddish color.

Astaxanthin can be extracted of seaweed, bacteria and also of crustaceans as the pink-shrimp.

The pink-shrimp is amply captured in the southern region of Rio Grande do Sul, where their processing generates more than 60% of waste.

The use of such waste emerges as an alternative to problems of the environmental impact of their eviction from the Pato's lagoon, as well as an alternative source of resources for industries and local fishermen.

In this context, the aim of this study is the obtainment of carotenoprotein using wastes from pink-shrimp processing (*Farfantepenaeus Paulensis*) through the proteolytic enzyme Flavourzyme, and its chemical purification, aiming to evaluate which of the process variables have significant effects. Once obtained the extract, its stability was studied faced to light and temperature, using astaxanthin dissolved in soy resin oil.

To analyze the variables that really influenced the process of carotenoprotein obtainment, it was used an experimental design saturated 2<sup>3</sup>, with three independent variables in two levels: time (2 and 3h), temperature (40 and 50 °C) and concentration enzyme/substrate (0.1 and 0.3%) and as dependent variables the yield, lipids and proteins percentage, with three central points.

The best conditions for processing were hidrolsys time of 2 hours and 50°C of temperature, concentration enzyme/substrate of 0.3%, and the yield obtained on the process was 9.4%, protein level of 70,9% and lipids of 1.6%.

To the process of chemical purification of the carotenoprotein it was also used an experimental design saturated 2<sup>3</sup>, with three independent variables in two levels: time of extraction (80 and 280 minutes), temperature of chemical extraction (26,6 and 43,4 °C) and hexane and acetone proportion (8 and 92%) and as dependent variable the astaxanthin concentration, with three central points and two axial points considering

an chemical extraction time of 120 minutes, extraction temperature of 30°C and hexane and acetone in a 25% proportion the highest astaxanthin concentration gained was 197,41 ppm.

Finally the stability of the resin oil faced to heat was studied, presenting stable during the 8 early hours of exposure to temperature of 105°C.

Faced to light, the oil resin became stable during 7 days.

Keywords: Carotenoprotein, enzymatic hydrolysis, chemical purification, Astaxanthin.



## **CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO**

## 1.1 INTRODUÇÃO

Os carotenóides são corantes naturais, definidos segundo BOBBIO e BOBBIO (1992) como compostos de estrutura isoprenóide, divididos em carotenos e xantofilas, dentro das quais encontra-se a astaxantina, um carotenóide de grande ocorrência em animais marinhos e aquáticos, tendo destaque comercial o salmão e a truta arco-íris, onde esta substância lhes confere uma coloração rosada quando presente em níveis suficientes. Estes animais não podem sintetizar a astaxantina, motivo pelo qual este carotenóide deve estar presente na dieta, seja ela natural, no caso de animais selvagens, ou artificial, no caso de animais de cativeiro, por meio de sua adição em rações para aquicultura, com a intenção de corar a carne destes peixes (TORRISEN, 1995; TORRISEN E CHRISTIANSEN, 1995). A astaxantina é encontrada em crustáceos, como o camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), o qual desempenha importante papel econômico-social no estado do Rio Grande do Sul, seu maior produtor com 41,5 % do total nacional.

O estudo dos carotenóides, pigmentos amplamente encontrados na natureza, teve início no século XIV, mas o interesse nestes compostos é crescente. Em virtude da diversidade de funções que lhes são atribuídas, o seu estudo reúne pesquisadores das áreas mais variadas como químicos, biólogos, agrônomos, médicos, engenheiros, tecnólogos e nutricionistas. Em relação aos alimentos, pelo menos cinco funções já foram citadas: corante natural responsável pela cor atraente de muitos alimentos (como contribuinte natural dos alimentos ou como aditivo); precursor de vitamina A; seqüestrador de oxigênio, propriedade que os torna protetores de lipídeos contra oxidação; inibidor de determinados tipos de câncer; precursor de compostos voláteis, responsáveis pelo aroma dos alimentos (RODRIGUES-AMAYA, 1988, citado por PRENTICE, 1994).

A pesca de camarão é uma atividade de produção primária dependente de fatores econômicos, sociais e ambientais, praticada nos mais diversos ecossistemas: marinhos, estuarinos ou de água doce. O Brasil, por possuir vasto litoral e grande potencial hídrico, com várias bacias hidrográficas, além de uma grande biodiversidade de fauna marinha, possui grande potencial pesqueiro de camarões, sendo a produção brasileira de camarão por captura estimada em cerca de 22 mil toneladas anuais (FAO/WHO, 2001). Porém, seguindo a tendência mundial, a produção de camarão por captura está em declínio no Brasil, enquanto a produção do camarão em cativeiro (carcinicultura) tem aumentado (BNDES, 2001). As dificuldades de abastecer a demanda mundial de animais marinhos apenas com a pesca é a principal razão do crescimento do cultivo em cativeiro destes animais (aquicultura).

Durante o processamento do camarão, através da etapa de descasque, são geradas grandes quantidades de resíduo sólido, tendo em vista que cabeça e cascas do animal correspondem a aproximadamente 40% de seu peso total, sendo tal resíduo composto por cerca de 70 a 75% de água (GILDBERG E STENBERG, 2001). Este resíduo é em geral clandestinamente enterrado ou jogado no mar ou em rios, causando problemas ambientais, principalmente em países que possuem uma grande produção de camarão e que não há rigor na fiscalização ambiental.

Tendo em vista que este resíduo é constituído por quitina, proteínas, carbonato de cálcio e pigmentos (ZAKARIA et al., 1998), tem havido grande interesse em seu reaproveitamento, buscando alternativas à sua disposição final, com vista ao desenvolvimento de produtos de valor agregado.

Processos biotecnológicos juntamente com os processos químicos podem propiciar uma melhor extração e um produto final com maior qualidade. A matéria-prima é submetida à hidrólise pela ação de enzimas microbianas, depois de realizada a reação de hidrólise a enzima é inativada por aquecimento e é realizada a purificação química com intuito de obter os produtos finais desejados.

Visando gerar informações técnicas, o objetivo principal deste trabalho foi usar a combinação dos processos enzimático e químico, estudando os parâmetros de extração adequados para recuperação dos carotenóides presentes nos resíduos do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) e analisar sua estabilidade frente ao calor e à luz, com o intuito de aplicar em alimentos para consumo humano direto.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um processo para a obtenção e purificação dos carotenóides presentes no resíduo da industrialização do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) através da combinação de processo biotecnológico com o químico.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os parâmetros de extração adequados para obtenção de carotenoproteína a partir de processo enzimático;
- Utilizar um processo químico para definir as condições ótimas de purificação do carotenóide astaxantina, presente na carotenoproteína extraída pelo processo enzimático.
- Realizar o estudo de estabilidade dos carotenóides presentes numa oleoresina contendo astaxantina, frente à luz e à temperatura.

## **CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 HISTÓRICO PESQUEIRO DA ZONA SUL DO RIO GRANDE DO SUL

A produção de pescado no Brasil em termos de capturas desembarcadas pela pesca extrativa, aqüicultura marinha e continental, tem atingido níveis próximos a um milhão de toneladas anuais. Responsável por cerca de metade dessa produção em 2001, a pesca marinha tem se concentrado nos recursos costeiros e da plataforma continental, dentre os quais tem se destacado historicamente a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) e o camarão-rosa (*Farfantepenaeus spp.*) na costa Norte; as lagostas vermelha e verde (*Panulirus spp.*) e o pargo (*Lutjanus purpureus*) na costa Nordeste; a sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) e o camarão-rosa (*Farfantepenaeus spp.*) no Sudeste e peixes demersais (principalmente da Família Sciaenidae) no Sul do Brasil (RIO GRANDE DO SUL,2002).

Durante cerca de trinta anos de exploração pesqueira, esses recursos sofreram reduções de abundância da ordem de 50 a 90% em decorrência, sobretudo, do excesso de capacidade das frotas pesqueiras atuantes nessas regiões. A despeito das limitações biológicas dos recursos pesqueiros marinhos da costa brasileira, parece evidente que a expectativa de incremento a curto-prazo da produção de pescado gerado a partir da pesca extrativa, não deverá se sustentar através do aumento significativo das capturas e sim de estratégias mais realistas direcionadas ao aproveitamento e a rentabilidade das capturas atuais. Segundo o IBAMA, em 2002 as regiões Sudeste e Sul rejeitaram entre 30 e 40% das capturas da pesca de arrasto a bordo. Além disso, cerca de 30% da biomassa desembarcada nos portos foi descartada pelas empresas de processamento de pescado, sob a forma de resíduo. Combinados esses elementos, pode-se inferir que metade do que é capturado, não é aproveitado como produto da pesca, tornando-se biomassa rejeitada, seja em mar aberto ou em terra. Essas estratégias dependerão da disponibilidade de inovações científicas e tecnológicas, da iniciativa do setor produtivo e do apoio do Poder Público brasileiro.

Tomando como ponto de referência a cidade do Rio Grande, pólo pesqueiro, percebe-se que o resíduo gerado nas fábricas de pescado pode ser melhor aproveitado. Um importante e significativo produto das indústrias pesqueiras é o camarão, o qual este gera uma quantidade de resíduos na faixa de 35% de sua massa, constituídos basicamente de cascas e cabeças, sendo que a quitina representa cerca de 5-7% destes resíduos.

O Rio Grande do Sul é hoje o quarto estado brasileiro mais importante na captura artesanal de pescado, atingindo em média de 25.724 toneladas de pescado entre os anos de 1980 e 1994, com destaque para os desembarques de bagre, cação,

corvina, pescada-olhuda, tainha e camarão. Este estado é o maior produtor brasileiro de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), com médias anuais de 3.195 toneladas, que representa 45,1 % da produção brasileira, sendo a captura efetuada exclusivamente pela pesca artesanal (RIO GRANDE DO SUL, 2002).

## 2.2 CAMARÃO

O Brasil é considerado como a nova fronteira para o desenvolvimento acelerado da carcinicultura, possuindo, após a China, o maior potencial de crescimento da produção de camarão em cativeiro do mundo, em função de uma série de condições favoráveis que incluem clima, recursos hídricos e naturais, infra-estrutura de apoio, mercado interno em expansão e disponibilidade de amplas áreas aptas para o cultivo. Em 1999 o país foi o terceiro maior produtor do Hemisfério Ocidental, atrás do Equador e México, tornando-se um dos líderes mundiais em produtividade na carcinicultura, ou seja, em quantidade produzida por área de cultivo (BNDES, 2001; EMBRAPA, 2001).

Em 1999 a produtividade da carcinicultura brasileira era a mesma da Tailândia (que é o maior produtor mundial de camarões), e em 2000 registrou média de 4 toneladas por hectare (BNDES, 2001), sinalizando para os efeitos da tecnologia de produção e gestão dos empreendimentos que, se bem dinamizados, podem representar um grande diferencial de vantagens comparativas para o Brasil. É importante considerar ainda o potencial de áreas produtivas, com a particularidade de que a base produtiva brasileira é composta de pequenos produtores - cerca de 94% dos empreendimentos de carcinicultura do País (CLUSTER DO CAMARÃO DO RN, 2001).

Segundo o Ministério da Agricultura e do Abastecimento (2001), o Brasil dispõe de um potencial de 300.000 hectares propícios para a carcinicultura marinha somente no Nordeste, sendo estimado para 2003 uma produção nacional de 105.000 toneladas em 35.000 hectares de viveiros. Além do cultivo de camarão marinho, o Brasil possui um grande potencial para o cultivo de camarões de água doce, o qual atualmente ainda encontra-se restrito a poucas fazendas, dispondo de uma área total de cerca de 200 hectares e de uma produção de 500 toneladas (FAO/WHO, 2001).

O camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), o qual está demonstrado na figura 2.1, tem uma distribuição conhecida desde Ilhéus (Bahia) até o litoral do Mar Del Plata, na Argentina. O Rio Grande do Sul apresenta alguns criadouros importantes na região costeira, porém não são conhecidas concentrações importantes de adultos na plataforma continental (ALMEIDA, 1997). Foram registradas duas áreas de maior

concentração da espécie na plataforma da região Sudeste/Sul: a principal no litoral de Santa Catarina e outra entre Santos e a Ilha de São Sebastião, São Paulo (ALMEIDA,1997).

A espécie ocorre em fundos de areia, areia lamosa, areia biodetrítica, areia com cascalho, lama e lama arenosa, podendo ser encontrada com frequência em pradarias *Ruppia maritima*. Na Laguna dos Patos é encontrado em ambientes com temperaturas variando de 7 a 30°C e salinidades entre 0 e 31 ppm. No entanto, distribuem-se mais abundantemente em áreas com salinidade abaixo de 10 ppm. A espécie tem hábito alimentar noturno e é onívora, sendo que os principais itens alimentares encontrados na dieta são: detritos orgânicos, algas, nematóides, poliquetas, moluscos, crustáceos e peixes (ALMEIDA, 1997).

A pesca de camarões do gênero *Penaeus*, no Brasil, está dividida em dois estratos: Industrial (plataforma continental) e Artesanal (estuários). A pesca industrial tem lugar frente às costas de Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. No Rio Grande do Sul não são conhecidas concentrações importantes na plataforma continental. Este fato pode ser considerado como causado, pelo menos parcialmente, pela elevada intensidade de pesca nos estuários (ALMEIDA, 1997).

A pesca artesanal é a principal responsável pelo desembarque de camarão-rosa no Rio Grande do Sul. Esta atividade é desenvolvida no interior dos estuários, salientando-se o complexo lagunar de Tramandaí, Lagoa do Peixe e Laguna dos Patos.

No Sudeste-Sul do Brasil a captura de camarão-rosa, pescado artesanalmente, têm apresentado valores superiores aos de pesca industrial no oceano. A captura na Laguna dos Patos representa uma fração bastante significativa no total da captura desta região e tem 70% do desembarque destinado ao mercado externo (ALMEIDA,1997).



Figura 2.1: Camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).



### 2.2.1 Resíduo de Camarão

Os resíduos oriundos do processamento industrial geram um problema econômico pelo fato de necessitarem de tratamento, além de um problema ambiental quando este procedimento não é realizado. Portanto, a adoção de alternativas para o uso deste resíduo é um meio de aumentar o faturamento das indústrias processadoras de camarão e diminuir a agressão ao meio ambiente.

O efluente líquido contém uma variedade de compostos orgânicos solúveis (principalmente proteínas) potencialmente recuperáveis. As tecnologias atuais de processamento de alimentos utilizam os sólidos presentes neste efluente para conferirem sabores característicos aos alimentos.

O aproveitamento do resíduo do processamento deve ser feito antes do desenvolvimento de microorganismos, o que pode impossibilitar seu uso (SCHOEMAKER, 1991).

### 2.2.2 Composição Química dos Resíduos de Camarão

#### 2.2.2.1 Componentes dos Resíduos

O exoesqueleto do camarão é composto basicamente de quitina, que é um polímero composto de cadeias não ramificadas do tipo  $\beta$  (1-4) N-acetil D-glucosamina, cuja estrutura é semelhante à da celulose e está sempre associada a uma fração protéica, ligadas através de enlaces covalentes e a um material inorgânico constituído principalmente de carbonato de cálcio, sendo este o responsável pela sua rigidez. Na análise de composição, a quitina é expressa na forma de fibra.

Nas análises dos lipídeos dos resíduos de camarão efetuadas por KRZECZKOWSKI, 1970, em camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), constatou-se que possuem uma alta porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados com vinte e dois carbonos, os quais geralmente estão associados com fosfolipídios de estrutura.

A composição dos ácidos graxos dos camarões de água salgada depende da dieta e da espécie. Nos estudos realizados por GALLAGHER e BROWN (1975) na carne de camarões da Baía de São Francisco (*Artemia salina*), os ácidos graxos mais importantes são  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$  e  $C_{20:5}$ . Neste estudo não foi encontrado o  $C_{22:6}$ . Porém KRZECZKOWSKI (1970) encontrou-o em grande quantidade nos resíduos de camarão, atingindo 13,4% dos ácidos graxos totais. A porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados nos resíduos (42,5%) e na carne crua de camarão (47 a 48%) é maior do que no camarão inteiro (38%). Isto é explicado pelo fato que nos processos

industriais de descascamento e remoção dos detritos, usa-se muita água e esta, carregaria os materiais solúveis e partículas finas, principalmente dos intestinos.

Quanto ao pigmento na casca do camarão, pode-se destacar o carotenóide conhecido como astaxantina.

### 2.2.2.2 Composição Química dos resíduos

HANSEN (2006) constatou que há uma variação na composição química entre os diferentes tipos de resíduos de camarão. O camarão de tamanho inferior ao comercial apresentou uma composição diferente quando descascado manualmente ou mecanicamente. Estes dados estão escritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composição química percentual de resíduos frescos de camarão.

	A		B		C		D	
	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca	Base Úmida	Base Seca
Proteína Crua	8,24	31,24	10,59	39,28	15,18	60,53	10,39	39,31
Gordura	0,64	2,43	1,09	4,05	1,28	5,11	0,95	3,59
Fibra Crua	5,07	19,22	4,21	15,66	1,51	6,02	4,13	15,62
Cinzas	9,79	37,11	8,31	30,91	4,6	18,34	8,32	31,48
Água	76,26	-	75,8	-	77,43	-	76,21	-

Fonte: HANSEN (2006). Notas sobre a industrialização do camarão.

- A= Resíduos de camarões descascados à máquina;
- B= Resíduos de camarões descascados manualmente;
- C= Camarões de tamanho inferior do comercial;
- D= Mistura de A, B e C.

Pode-se verificar que no processo manual há uma menor remoção de material protéico do que no processo mecânico. Tais observações foram constatadas também por HACKMAN (2006).

### 2.2.2.3 Produtos Obtidos dos Resíduos de Camarão

Os resíduos de camarão podem ser utilizados principalmente para a fabricação de farinha, um componente útil em rações para aquicultura. Entretanto o resíduo do processamento do camarão pode ser utilizado para outros propósitos; A quitina pode ser extraída do exoesqueleto da qual é obtida a quitosana, que pode ser utilizada no tratamento de efluentes, na indústria de alimentos e farmacêutica.

Pode ser obtida também a pasta de camarão e saborizantes utilizando-se somente a cabeça deste crustáceo. Estes produtos são obtidos com o uso de despolpadeira (SCHOEMAKER,1991).

A crescente demanda por produtos pesqueiros da costa brasileira, aliada a uma produção ineficiente e predatória, gera uma série de impactos ambientais que necessitam de soluções viáveis, tanto na questão econômica quanto na prática. Estas soluções, que ainda necessitam ser desenvolvida e/ou implantadas, têm como objetivo principal compensar, minimizar ou até mesmo evitar os impactos da pesca neste ambiente tão ameaçado pela atividade humana.

Segundo a Secretaria de Aquicultura e Pesca (SECRETARIA, 2004), a quantidade de embarcações de pesca artesanal que opera no litoral brasileiro está estimada em 27.000, compreendendo embarcações como jangadas, canoas, botes, entre outros. Tendo como característica pequeno raio de ação e, conseqüentemente, limitada autonomia no mar.

A pesca artesanal ocupa um importante papel no cenário da pesca nacional, pois esta é responsável por um volume de 60 % de toda a produção extrativa nacional. No entanto, dados revelam que 26 a 46 % do volume total capturado é rejeito (DELEVADOVE,1996).

Uma grande preocupação da indústria de alimentos, diz respeito à geração de resíduos provenientes do processamento das matérias primas. Estudos têm sido realizados no sentido de encontrar um destino adequado para os resíduos gerados pelas indústrias, de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas.

A cidade do Rio Grande é considerada um grande pólo pesqueiro devido a sua localização geográfica e a grande concentração de indústrias pesqueiras, conseqüentemente, a quantidade de resíduos gerados é consideravelmente grande. Um importante e significativo produto das indústrias pesqueiras é o camarão, constituídos basicamente de cascas e cabeças, e a quitina representa cerca de 5-7% destes resíduos.

Atualmente, vários programas de apoio à pesquisa, desenvolvimento e inovações têm surgido na aquicultura, e permitem perspectivas otimistas para a atividade de industrialização do pescado cultivado no Brasil. Surge o momento das tecnologias emergentes que dispõem o pescado ao consumidor na forma de alimento de conveniência e com valor agregado. Dentre as formas de aproveitamento da parte comestível do pescado pode-se destacar os produtos refrigerados combinado com as barreiras de atmosfera modificada e irradiação, congelado, empanado, enlatado, salgado, defumado, fermentado, marinado, minced (reestruturados como nuggets, fishburger, lingüiça, almôndegas, etc.), produtos reestruturados com transglutaminase; surimi e seus produtos (crab sticks, kamaboko, fish balls, fish rolls, seafood imitations, etc.), algas marinhas, etc. Dentre as formas de aproveitamento dos resíduos, tem-se: farinha, óleo, concentrado protéico, hidrolisado protéico, quitina e quitosana, pigmentos carotenóides (astaxantina), essência de pérola, curtimento de pele, silagem, dentre outros.

### **2.3 CAROTENÓIDES**

Os carotenóides formam um dos mais importantes grupos de corantes naturais e têm sido encontrados em diversas fontes animais e vegetais (ISLER, 1971, citado por PRENTICE, 1994).

Os carotenóides são pigmentos naturais que têm despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas há mais de um século. Extensamente distribuídos na natureza, estão presentes em plantas, animais e microrganismos (TEE, 1992).

Segundo alguns autores, não podem ser considerados apenas como mais um grupo de pigmentos, mas como substâncias com propriedades muito especiais. Dentre as funções conhecidas dos carotenóides estão a absorção de luz, atividade antioxidante, atividade anticancerígena, transporte de oxigênio, atividade pró-vitáminica A, sendo esta última apresentada por apenas alguns destes compostos (BAUERNFEIND, 1981).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 250 milhões de pré-escolares, particularmente em países em desenvolvimento apresentam deficiência de vitamina A (GLOBAL,1995). No Brasil, onde a hipovitaminose A é considerada uma das principais deficiências na área de Saúde Pública, a larga distribuição destes pigmentos em frutos e vegetais, aliada ao alto custo dos alimentos de origem animal que contêm vitamina A pré-formada, contribuem para que os carotenóides sejam uma importante fonte deste nutriente na dieta humana (SIMPSON, 1984).

Em geral, os valores de vitamina “A”, disponíveis na literatura, são baseados nos teores totais de carotenóides, não levando em conta apenas os carotenóides com atividade pró-vitáminica “A”. Assim sendo, estes valores podem ser superestimados, já que incluem carotenóides inativos e estereoisômeros de carotenóides (TRIGUEIRO e PENTEADO, 1992).

São consideradas como importantes propriedades físicas e químicas dos carotenóides: a inibição do oxigênio; a absorção de luz; o bloqueio dos radicais livres mediante reações; o seu caráter lipofílico, sua insolubilidade em água; sua facilidade de isomerização e oxidação; além sua capacidade de unir superfícies hidrofílicas (RODRIGUES- AMAYA, 1997).

Durante o cozimento dos alimentos, os carotenóides podem sofrer modificações. Estas são devidas ao alto grau de insaturação destes pigmentos, o que os torna susceptíveis às reações de degradação. Torna-se importante, portanto, avaliar as alterações causadas pelo tratamento térmico com relação aos carotenóides ativos dos alimentos (BIANCHINI e PENTEADO, 1997).

A alteração da composição dos carotenóides durante a preparação doméstica, processamento industrial e estocagem foi revisada recentemente. Devido à susceptibilidade destes pigmentos às reações de degradação torna-se importante avaliar as alterações causadas por processamentos térmicos diversos, o que tem despertado interesse de alguns pesquisadores.

O aspecto mais significativo dos carotenóides, além da cor que proporcionam aos alimentos, é o fato de representarem a principal fonte de vitamina “A”. Em países em desenvolvimento, a deficiência de vitamina “A” é considerada um dos mais graves problemas (TRIGUEIRO e PENTEADO, 1992).

Vários estudos, realizados em algumas regiões do Brasil, detectaram a prevalência de hipovitaminose A. Estima-se que os alimentos de origem vegetal, em especial as hortaliças verdes folhudas, possam servir como fonte alternativa e barata desta vitamina em alguns países em desenvolvimento, devido aos preços elevados dos alimentos de origem animal (DAVIES, 1976).

Os carotenóides têm sido relacionados com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer, enfermidades cardiovasculares, degeneração macular, relacionada com a idade e formação de catarata. Tais efeitos biológicos são independentes da atividade da pró-vitamina “A” e têm sido atribuídos à propriedade antioxidante dos carotenóides, porém este mecanismo ainda não está bem esclarecido (BRITTON, 1995; RODRIGUES-AMAYA, 1997).

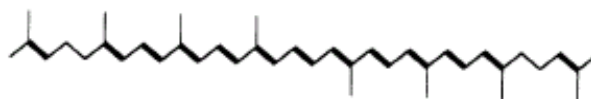
O  $\beta$ -caroteno pode ser obtido de várias frutas e vegetais, como cenoura, espinafre, pêssego e batata-doce (MANGELS et al., 1993). Também apresentam atividade de pró-vitamina A, o  $\alpha$ -caroteno encontrado na cenoura, na abóbora, na pimenta vermelha e amarela e a criptoxantina presente na laranja, tangerina, pêssego, nectarina e papaia (MANGELS et al., 1993).

São conhecidos aproximadamente 600 tipos de carotenóides naturais (ONG e TEE, 1992). Estes podem ser facilmente obtidos por extração a frio com solventes orgânicos.

A mudança de cor no amadurecimento dos frutos ou envelhecimento de vegetais é causada pelo desaparecimento das clorofilas, já que, enquanto presentes mascaram a cor dos outros corantes. Durante o amadurecimento das frutas, os cloroplastos nelas existentes, geralmente, se transformam em cromoplastos, estimulando, assim, a síntese de novos carotenóides (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Quimicamente os carotenóides são substâncias tetraterpênicas, formadas por oito unidades de isopreno, de tal modo que a ligação isoprênica sofre reversão na parte central da molécula e dessa maneira os dois grupos metílicos centrais ficam separados por três carbonos (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

A estrutura do licopeno (Figura 2.2), pigmento encontrado no tomate é considerada a estrutura fundamental dos carotenóides, da qual podem ser derivadas outras estruturas por reações de hidrogenação, ciclização, oxidação ou combinação destes métodos. São também considerados carotenóides alguns compostos formados por rearranjos ou degradação do licopeno (BOBBIO e BOBBIO, 1992).



Licopeno

Figura 2.2: Estrutura do licopeno.

Fonte: BOBBIO e BOBBIO, 1992.

Cada dupla ligação pode ocorrer nas condições cis e trans, embora na natureza sejam encontrados mais freqüentemente compostos em que todas as duplas ligações estejam na configuração trans (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Os carotenóides são divididos em carotenos, compostos constituídos por carbono e hidrogênio e seus derivados oxigenados, as xantofilas. Tem cor intensa que

varia do amarelo ao vermelho, mudando para azul por reação com ácido sulfúrico ou tricloreto de antimônio (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

A cor intensa dos carotenóides é devido ao grande número de insaturações conjugadas presentes na molécula. Quanto maior o número destas insaturações, mais intensa é a cor do composto. Logo, a adição de uma dupla ligação carbono-carbono a um composto, sem outras modificações na molécula, desloca a absorvância máxima deste composto para um comprimento de onda maior (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Os carotenóides são suscetíveis à isomerização e oxidação durante o processamento e estocagem, as conseqüências práticas são a perda da cor e atividade biológica e a formação de compostos voláteis que conferem sabor desejável ou indesejável em alguns alimentos. O processo de oxidação depende da presença de oxigênio, metais, enzimas, lipídeos insaturados, pré-oxidantes ou antioxidantes, exposição à luz, tipo e estado físico do carotenóide presente, rigor do tratamento (destruição da ultraestrutura que protege os carotenóides, aumento da área superficial e dos parâmetros tempo e temperatura do tratamento térmico), material de embalagem e condições de estocagem (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999).

## **2.4 CAROTENOPROTEÍNA**

A carotenoproteína é um complexo de proteínas e carotenóides, entre eles a astaxantina encontra-se com maior abundância. A carotenoproteína é usada como suplemento alimentar em rações para peixes e como corante e aromatizante em produtos alimentícios (CHAKRABARTI, 2002).

SHIMAHARA et al. (1982) utilizou com sucesso a bactéria proteolítica *Pseudomonas maltophilia* em carapaças de crustáceos para desproteinização.

É de grande importância a adição de algum antioxidante para extrair a carotenoproteína com intuito de cessar a atividade oxidativa e retenção da cor brilhante vermelho-alaranjado da carotenoproteína (HAARD e SIMPSON, 1994). A carotenoproteína é mais estável, em relação aos pigmentos carotenóides sozinhos (CANO-LOPES et al., 1987).

Comumente, são utilizados processos biotecnológicos para extrair a carotenoproteína de resíduos de camarão, através do uso de enzimas proteolíticas e bactérias (SHIMAHARA et al., 1982).

## 2.5 ASTAXANTINA

Quimicamente, a astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$ '-caroteno-4,4'-diona), apresentada na Figura 2.3 é classificada como uma xantofila, da família dos carotenóides com radicais específicos ligados aos anéis benzênicos. Também não apresenta o anel  $\beta$ -ionona, característico dos carotenóides precursores de vitamina A, não sendo, portanto, precursora desta vitamina (MAHER, 2000).

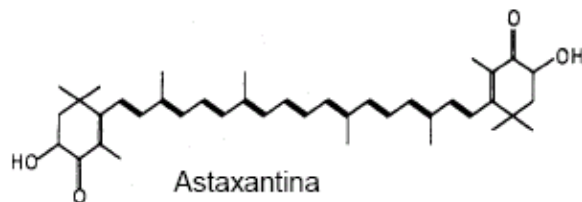


Figura 2.3: Estrutura química da astaxantina.

Fonte: [www.astaxanthin.org](http://www.astaxanthin.org)

A astaxantina é o carotenóide de maior ocorrência em animais marinhos e aquáticos, tendo destaque o salmão e a truta arco-íris, onde este carotenóide lhes imprime uma coloração rosada quando presente em níveis suficientes. A truta e o salmão, como outros animais, não podem sintetizar a astaxantina, a qual é obtida pela dieta natural constituída de zooplâncton, os quais têm como alimento microalgas, os produtores originais de carotenóides. Também pode haver adição comercial de astaxantina em rações para aquicultura (TORRISEN e CHRISTIANSEN, 1995). Recentemente a astaxantina tem adquirido grande importância na indústria de cosméticos. A astaxantina encontra-se unida com a proteína, uma estrutura especial que determina a coloração do pigmento, que no caso do camarão produz uma coloração rosa-alaranjado (CANO-LÓPES et al., 1987).

Segundo BERNHARD (1990), a coloração característica de salmão e truta selvagem somente ocorre em animais cultivados em cativeiro pela adição deste pigmento em sua alimentação.

A síntese da astaxantina nos organismos inferiores tem início com o acetil-CoA seguido por intermediários importantes como fitoeno, licopeno,  $\beta$ -caroteno e cantaxantina (MAHER, 2000).



## 2.6 MATÉRIAS-PRIMAS PARA OBTENÇÃO DA ASTAXANTINA

A astaxantina encontra-se presente em resíduos de camarão, nas algas *Haematococcus pluvialis*, nos fungos *Paffia Rhodozyma*, Salmão Sockeye, salmão Atlântico, Truta Arco-Íris, Óleo de Krill, Farinha de Crawfish, Leveduras (*Pfaffia r.*), entre outras fontes.

A alga *Haematococcus pluvialis* é a maior fonte de astaxantina, sendo utilizada comercialmente como corante de rações para salmão e outros peixes, entretanto, a truta arco-íris apresenta uma das menores fontes de astaxantina. (MAHER, 2000).

Entre os organismos produtores de astaxantina, a alga verde *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma* são atualmente consideradas de maior interesse industrial (GOODWIN, 1992; KOBAYASHI et al., 1993). Entre estes, merece atenção especial a levedura em função de sua qualidade nutricional e segurança na utilização como aditivo alimentar para peixes, suprimindo além da astaxantina, vários nutrientes como proteínas, carboidratos e lipídios (MARTIN et al., 1993).

A levedura *Phaffia rhodozyma* é um fungo Basidiomiceto e foi isolado por Herman Phaff na década de 70. Esta levedura fermenta a glucose e tem como característica marcante a produção de carotenóides, em especial a astaxantina, que corresponde a cerca de 80% da mistura total de carotenóides produzidos (JOHNSON e AN, 1991).

Entretanto existe um impedimento para a utilização da levedura *Phaffia rhodozyma* em bioprocessos para produção industrial da astaxantina. A sua parede celular oferece uma barreira à absorção do pigmento por algumas espécies, reduzindo a sua biodisponibilidade. A parede celular da levedura é resistente, mesmo a métodos de lise enzimática e mecânica, principalmente quando se busca uma ampliação de escala laboratorial para industrial (CALO e GONZÁLEZ, 1995; SANTOPIETRO et al., 1995).

A astaxantina comercial é produzida por síntese química e estão sendo procuradas alternativas naturais devido a crescente preocupação com a segurança alimentar e aspectos dos pigmentos sintéticos. Entre estas alternativas estão as prometedoras microalgas *Haematococcus pluvialis*, embora sua produção apresente vários problemas. A microalga tem um crescimento baixo e a astaxantina é um subproduto que se acumula quando o crescimento celular é parado e a microalga está numa fase celular chamada aplanospora, semelhante a uma fase resistente. Nesta fase a *H. pluvialis* tem uma parede celular muito rígida, restringindo a extração do

pigmento e assimilação quando ingerida pelos peixes. Vários estudos comprovaram a segurança no consumo da astaxantina produzida pela alga *Haematococcus Pluvialis*.

O Estado do Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), com média anual de 3.195 toneladas, que representa 41,5% do total produzido, sendo a captura efetuada exclusivamente pela pesca artesanal (RIO GRANDE DO SUL, 2002). O resíduo de camarão é composto de cabeça e exoesqueleto (incluindo a cauda). Segundo SCHOEMAKER (1991), dependendo da espécie e método de processamento, o resíduo pode ultrapassar 60% do peso inicial.

Os resíduos oriundos do processamento industrial geram um problema econômico, pelo fato de necessitarem de tratamento, além de um problema ambiental quando este procedimento não é realizado. Portanto, a utilização deste resíduo é um meio de diminuir a agressão ao meio ambiente. Devido a grande disponibilidade de matéria-prima (resíduo de camarão-rosa) na cidade do Rio Grande-RS, o processo de extração do carotenóide astaxantina torna-se viável, pois segundo LORENZ e CYSEWSKI (2004), a astaxantina natural é vendida por aproximadamente U\$2.500,00 o quilograma. Como existe em nível mundial uma crescente procura por produtos naturais, as empresas produtoras de astaxantina percebem isso como uma grande oportunidade comercial (MARGALITH, 1999).

## **2.7 EXTRAÇÃO DA ASTAXANTINA**

O método mais comumente usado para extração do carotenóide astaxantina é através do *Processo Químico*. A extração da astaxantina deve ser feita com solvente não polar já que a mesma é lipossolúvel, geralmente a extração deve ser realizada o mais rápido possível, evitando a exposição à luz, oxigênio e altas temperaturas, visando minimizar os processos de degradação, sendo por estes fatores, recomendado que o processo de extração se realize em ambiente protegido de luz (BRITTON, 1991; MERCADANTE et al., 1999, citados por SU et al., 2002).

Solventes apolares, como hexano, heptano e isoctano são eficientes nos processos de extração de carotenóides em geral, o que não ocorre com solventes polares como acetona, metanol e etanol que tem eficiência na extração das xantofilas. Estes solventes são bastante utilizados em estudos, segundo SU et al., 2002, que tratam da extração de carotenóides de amostras de alimentos.

Em alimentos que apresentam grande quantidade de água é desejável o uso de um solvente orgânico que seja miscível com água, facilitando o rompimento da

ligação carotenóide-proteína, bem como prevenir a formação de emulsões, segundo o descrito por KHACHIK et al. (1992), citado por SU et al., 2002.

BUCHWALDT (1968) extraiu astaxantina de cascas de lagosta utilizando como solvente a acetona. O extrato contendo astaxantina e acetona foi novamente extraído com cloreto de metileno, seguido de uma lavagem com cloreto de sódio para eliminação de resíduos de acetona e posterior evaporação, resultando em um extrato oleoso. A astaxantina foi obtida na forma de cristais, sendo armazenada na ausência de luz e temperatura inferiores que 35°C.

Em outro estudo realizado por SEYMOR et al. (1996), astaxantina foi extraída de resíduos de camarão com etano a 95%, submetidos a processo de homogeneização e filtração, seguidos de evaporação do solvente.

MEYER et al. (1985) utilizou como solventes de extração para a astaxantina de resíduos do processamento de lagostin: óleos de arenque, xixarro e soja refinado, sob temperatura de 90°C por 30 minutos, posterior separação centrífuga de um pigmento oleoso. O extrato oleoso obtido com óleo de soja refinado continha 778 ppm de astaxantina e 335 ppm de astaceno; o extrato obtido com óleo de arenque continha 656 ppm de astaxantina e 449 ppm de astaceno e o extrato obtido com óleo de xixarro foram obtidos 692 ppm de astaxantina e 471 ppm de astaceno.

Em estudo realizado por SANG et al. (2002), pigmentos corantes foram obtidos de resíduo de camarão por meio de extração com solventes, sendo realizado também um estudo de estabilidade. O resíduo de camarão foi seco a 80°C por 4-6 horas, sendo posteriormente triturado. O procedimento de extração utilizou 100g deste resíduo seco triturado e como solvente 1L de uma mistura de acetona e éter de petróleo em uma proporção 1:2 por um período de 3-4 horas. A fase líquida foi então lavada com uma solução aquosa de NaCl 5%, sendo separadas duas fases (fase superior: hexano e pigmentos corantes e fase inferior: acetona e NaCl 5%) por meio de um funil de separação. A fase inferior foi lavada com 1L de éter de petróleo, submetido a agitação por um período de 3 a 5 minutos para retirada de algum corante remanescente, sendo este extrato adicionado ao extrato inicial contendo somente éter de petróleo. O extrato final foi armazenado em garrafas escuras para análise posterior em espectrofotômetro. Como resultado deste estudo o pigmento extraído apresentou-se como uma mistura de astaxantina e astacina e outros componentes.

A extração da astaxantina pode também ser feita pelo *Processo Enzimático*. Foi usada a enzima microbiana Flavourzyme para fazer a hidrólise com parâmetros controlados, posteriormente estas enzimas foram inativadas, após foi efetuado uma filtração com pano para separar o resíduo sólido da carotenoproteína. A carotenoproteína foi separada através de centrifugação a 7000 x g. O processo

enzimático proporciona a obtenção de uma maior gama de produtos finais, tais como a carotenoproteína, a obtenção da astaxantina nos sólidos em suspensão e ainda pode-se obter a quitina e a quitosana.

A interação do *Processo Químico* com o *Processo Enzimático* nos proporciona a obtenção de um maior número de produtos finais desejados, tais como os acima citados e um maior rendimento.

## 2.8 APLICAÇÕES DA ASTAXANTINA

A astaxantina é comumente utilizada em todo o mundo como suplemento em rações para aquicultura. Nos Estados Unidos é permitido até 80 mg/kg de ração para a obtenção de coloração vermelho-alaranjada. Além de atuar como aditivo de cor, a astaxantina tem mostrado atividade preventiva na oxidação de lipídeos durante o armazenamento da truta arco íris congelada, ou seja, prevenção da rancidez (JENSEN et al., 1998). É permitido o uso de astaxantina na indústria da aquicultura pelo Food and Drug Administration of the United States (TURUJMAN et al., 1997, citado por YUEN e CHEN, 1999).

Segundo TORRISEN E CHRISTIANSEN (1995), na indústria avícola o suprimento deste pigmento confere uma coloração mais acentuada às gemas dos ovos. Além disso, tem sido descobertos vários aspectos benéficos em relação à criação e a saúde animal. De acordo com LIGNELL et al. (1998), quando presente na dieta de aves, houve aumento na produção de ovos, na resistência a infecção por *Salmonella* por parte dos frangos e na vida útil dos ovos.

A astaxantina é empregada na avicultura (aumento na produção e coloração da carne de galinha e gema de ovos), mas sua principal aplicação é na aquicultura de peixes (salmão, truta) e crustáceos (lagosta), para os quais a coloração da carne e/ou carapaça é um fator determinante na aceitação e no preço final do produto (DIKE et al., 1992; STOREBAKEN, 1992). Além disso, este carotenóide possui elevada atividade antioxidante, quando comparado com o  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -tocoferol (TERÃO, 1989). A atividade antioxidante da astaxantina é cerca de dez vezes maior em relação à zeaxantina, luteína e cantaxantina e  $\beta$ -caroteno (MIKI, 1991).

Por ser a síntese química da astaxantina complexa e de elevado custo, devido à presença dos centros quirais na sua estrutura molecular, existe um grande interesse no uso de fontes biológicas da mesma (REYNDERS et al., 1996).

Não têm sido relatados dados sobre efeitos adversos associados à administração de astaxantina em animais. Várias tentativas foram feitas no sentido de encontrar a dose letal para animais, porém não obtiveram sucesso, atingindo valores

de 8 gramas de astaxantina por quilo corporal pelo período de dez dias e nenhum efeito tóxico foi observado. Há uma probabilidade de que efeitos similares possam ser obtidos em humanos. Doses na ordem de 2 a 4 mg por dia de astaxantina tem sido sugeridas (MAHER, 2000).

Um estudo sobre efeitos da astaxantina em humanos realizado no Japão, visando sua utilização em uma bebida protetora das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da oxidação, a astaxantina foi administrada por mais de duas semanas, diariamente, em três dosagens (3.6, 5 e 7.2 mg/dia) a dois grupos de cinco indivíduos e um de três, respectivamente, onde nenhum efeito colateral foi relatado, sendo observado um aumento no efeito antioxidante da astaxantina sobre LDL, na medida em que a dosagem aumentava (MIKI et al. 1998).

Estudos comprovam a ação preventiva de alguns carotenóides, dentre eles a astaxantina, em cânceres de esôfago, estômago, reto, próstata, ovário, endométrio, bexiga e pele. Estudos realizados em ratos indicaram que os níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade), também conhecido como “bom colesterol”, tiveram significativo aumento quando inserida astaxantina em sua dieta, o que não aconteceu quando  $\beta$ -caroteno lhes foi administrado. Porém devem ser feitos testes em humanos para averiguar se o efeito seria semelhante (MAHER, 2000).

O interesse pela produção e comercialização da astaxantina visando o consumo humano direto também tem aumentado, pela iminência na aprovação pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA), para o uso como ingrediente em suplementos dietéticos e por sua aprovação em diversos países europeus (LORENZ e CYSEWSKI, 2004).

### **CAPÍTULO 3 – MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. MATERIAL**

#### **3.1.1 Matéria-prima**

Foram utilizados resíduos do processamento de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) provenientes de indústrias de processamento de pescado localizadas na cidade de Rio Grande/ RS; Estes resíduos eram compostos por cascas e cabeças. Logo após, os resíduos foram transportados em monoblocos com gelo até o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), para ser realizado o processamento.

#### **3.1.2 Infra-estrutura**

O trabalho foi desenvolvido principalmente no laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), com o auxílio dos laboratórios de Bioquímica Tecnológica, de Bioquímica de Alimentos e do laboratório de Análise de Alimentos, todos localizados no Campus Cidade da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

#### **3.1.3 Reagentes e Enzimas**

A enzima usada para realizar a hidrólise enzimática foi a enzima Flavourzyme, fornecida pela Novozyme de Araucária -PR. Para as análises todos reagentes analíticos foram de qualidade P. A.

#### **3.1.4 Equipamentos**

Para a caracterização proximal de matéria-prima e do produto final foram utilizados estufa com circulação forçada de ar e temperatura controlada, mufla, extrator de Soxhlet, digestor e destilador de proteína.

Para hidrólise e extração da carotenoproteína foram utilizados: moinho de facas doméstico, liquidificador industrial, reatores de vidro com jaqueta de 500 mL, banho ultratermostatizado, agitador de hélice mecânico digital, termômetro e centrífuga.

Para a purificação da carotenoproteína foram utilizados: balão de vidro com três bocas, agitador de hélice digital, condensador de vidro, termômetro, funil de separação de 1000 mL e espectrofotômetro UV/VIS.

Para efetuar o estudo da estabilidade da oleoresina frente ao calor e a temperatura foram utilizados: bomba de vácuo, evaporador rotativo e outras vidrarias de uso cotidiano de laboratório.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Metodologia Analítica

#### 3.2.1.1 Caracterização da Matéria-Prima e do Produto Final

A determinação da umidade foi realizada de acordo com o método gravimétrico que se baseia na evaporação da água presente na amostra em estufa a 105<sup>o</sup> C até peso constante, segundo A.O.A.C. (1995).

O método utilizado para a determinação das cinzas consistiu na incineração dos compostos orgânicos, restando somente os compostos inorgânicos, segundo A.O.A.C. (1995).

O teor de lipídeos foi determinado segundo o método de extração de Soxhlet, baseado na extração intermitente da fração lipídica pelo uso de um solvente, de acordo com A.O.A.C. (1995).

A quantificação de proteínas foi realizada empregando a metodologia oficial para determinação de nitrogênio total pelo Método semi-micro Kjeldahl, de acordo com A.O.A.C. (1995).

#### 3.2.1.2 Quantificação da Astaxantina

A astaxantina presente nos extratos foi quantificada segundo método espectrofotométrico, recomendado por FAO/WHO (1982). Foi baseado na lei de Lambert-Beer, utilizando-se o comprimento de onda característico de 472 nm. A porcentagem total de carotenóides foi expressa em astaxantina, visto que de acordo com MEYERS (1985), a astaxantina representa aproximadamente 90% dos carotenóides presentes em crustáceos. Para a quantificação foi utilizado o valor de absorvidade específica de  $1,24 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (BUCHEALDT e JEMCKS, 1968), aplicado na Equação 3.1.

$$A = \epsilon.b.c \quad (3.1)$$



Onde:

A: Absorbância a 472 nm;

$\epsilon$ : Absortividade específica ( $1,24 \times 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

b: Espessura da cubeta (1 cm)

c: Concentração

A concentração obtida em mol/L foi multiplicada pelo peso molecular da astaxantina (596,84 g/mol), obtendo-se assim a concentração de astaxantina em ppm.

### **3.2.1.3 Estudo da estabilidade dos carotenóides frente à luz e temperatura**

Para a apresentação do produto final, a astaxantina foi isolada em óleo de girassol refinado comercial, conforme recomendado por SACHINDRA e MAHENDRAKAR (2004) e pela legislação vigente Resolução – CNNPA n° 44, de 1977, que especifica este óleo como um dos veículos passíveis de utilização na constituição de um corante, como uma oleoresina de astaxantina.

Para este processo, foi adicionado em proporção 1:1 de óleo de girassol comercial ao extrato (astaxantina em hexano) e submetido à evaporação à vácuo à temperatura de 40°C em evaporador rotativo até que restasse somente o volume de óleo de girassol adicionado.

O estudo da estabilidade da oleoresina contendo os carotenóides astaxantina e astacina foi realizado conforme CHOI (2002) e ANTONY, et al., (1999). Foi necessário que o hexano fosse evaporado do extrato, pois conforme decreto n° 555.871 de 26 de Março de 1965 da CNNPA, não é permitida a presença deste solvente em alimentos.

Este estudo foi uma avaliação qualitativa, uma vez que não foi quantificada a concentração do carotenóide presente em cada ponto de retirada da amostra. Analisou-se o comportamento do carotenóide frente ao calor e à luz através da queda da absorbância (unidades de absorbância) em função do tempo, em relação ao tempo zero.

#### **3.2.1.3.1 Estabilidade da oleoresina ao calor**

Para a avaliação do efeito da temperatura sobre a estabilidade da oleoresina utilizou-se estufa a 105°C. Foram colocados 10 mL da oleoresina em tubos de ensaio com tampa e cobertos com papel alumínio para evitar a influência da luz no processo. A seguir mediu-se em espectrofotômetro (472 nm) a absorbância destas amostras (PRENTICE, 1994).

### 3.2.1.3.2 Estabilidade da oleoresina à luz

O efeito da luz foi analisado segundo PRENTICE, (1994), MOSS & WEEDON (1976) e NAJAR et al (1988). Foram colocados 10 mL da oleoresina em tubos de ensaio. Do total de tubos, metade foi estocada no escuro e o restante foi exposto a uma lâmpada fluorescente de 15 W Osram, modelo Day Light.

Os tubos foram protegidos contra qualquer outra fonte de luz e suas posições foram trocadas regularmente. Foram retiradas amostras em triplicata dos tubos expostos à luz e os que se encontravam no escuro. A seguir foi medida a absorvância das amostras em espectrofotômetro em 472nm para efeito de comparação.

As constantes de velocidade de reação de degradação (K) bem como os tempos de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foram calculados pela equação de Arrhenius (KUSKOSKI et al., 2000).

## 3.2.2 Processamento

### 3.2.2.1 Processo de obtenção de carotenoproteína através de hidrólise enzimática

O processo de extração da carotenoproteína iniciou com a lavagem dos resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), trituração e micronização. Durante a micronização foi adicionado 2% de metabissulfito de sódio e uma proporção de 3:7 de solução tampão pH 7,5 em relação a massa de resíduo de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*). Após a micronização, foi efetuada a reação de hidrólise com parâmetros controlados. Terminada a reação de hidrólise enzimática foi efetuada filtração com pano para separar o resíduo sólido. A seguir, foi feita a inativação da enzima por calor, usando temperatura de 90° C por 10 minutos e esperou-se até o resfriamento. A seguir, adicionou-se na solução filtrada, ácido fosfórico 1% até atingir o ponto isoelétrico da proteína (pH=4,6). Após isto, foi realizada centrifugação a 7000 x g por 1 hora, o sobrenadante foi descartado e a carotenoproteína precipitada foi submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40°C, foi feito a adição de sorbato de potássio 1% e a carotenoproteína foi armazenada no escuro a temperatura ambiente, reservada para análise.

Na Figura 3.1 pode-se observar o fluxograma utilizado para obtenção da carotenoproteína através do hidrolisado enzimático do resíduo de camarão-rosa.

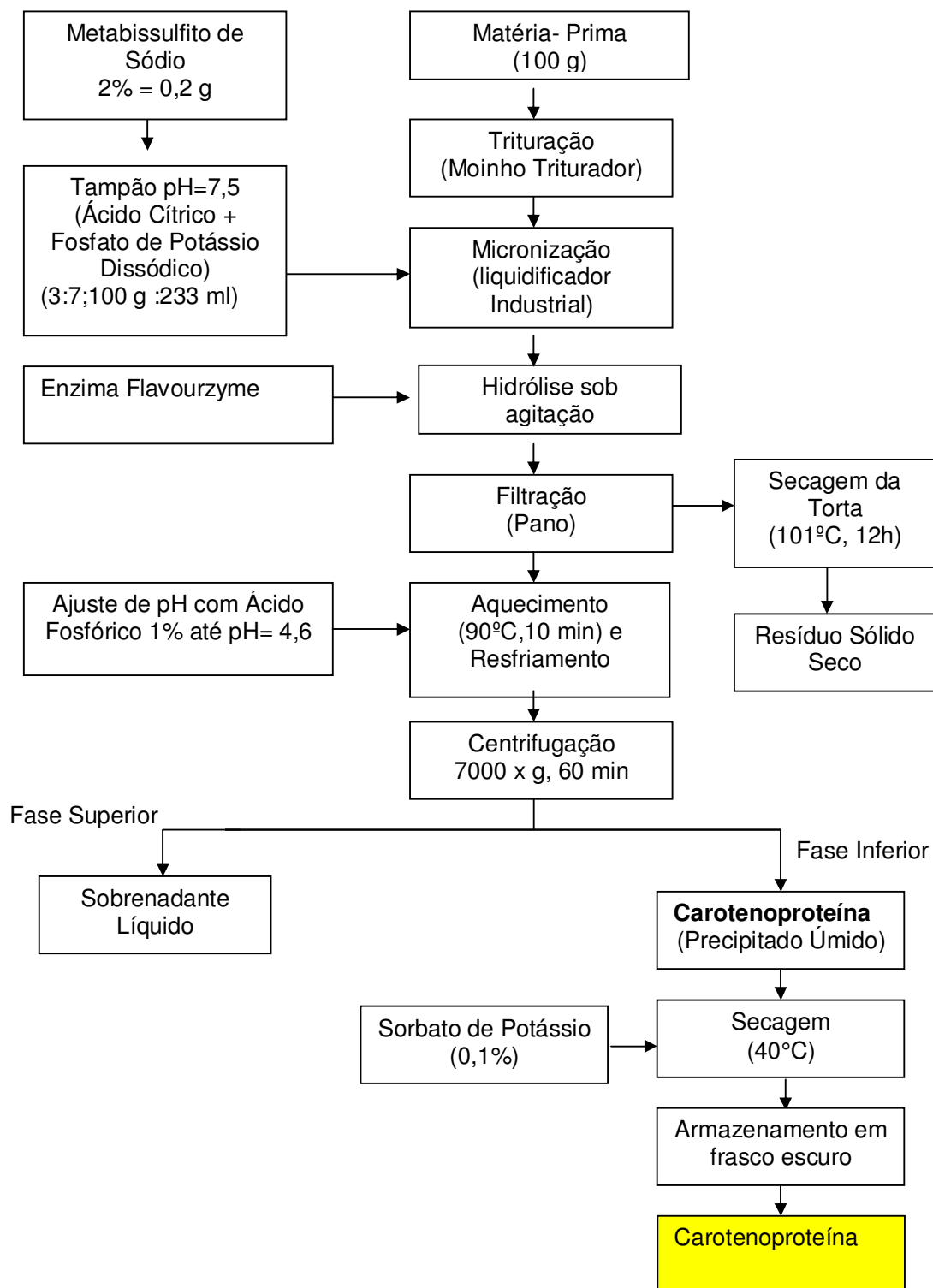


Figura 3.1: Fluxograma utilizado para obtenção da carotenoproteína através do hidrolisado enzimático do resíduo de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).

Foi realizado um planejamento experimental para definir as variáveis do processo de hidrólise enzimática que influenciaram na obtenção da carotenoproteína. Optou-se pelo planejamento fatorial  $2^3$  com três variáveis independentes tempo, temperatura de reação de hidrólise e concentração de enzima/substrato com três pontos centrais, apresentadas na Tabela 3.1. Como variáveis resposta foram avaliados o rendimento do processo, teor de proteínas e de lipídios, sendo estas determinações realizadas em triplicata.

Tabela 3.1: Matriz do planejamento experimental  $2^3$  utilizando enzima Flavourzyme para obtenção da carotenoproteína através de hidrólise enzimática.

Ensaio	Tempo de Hidrólise (h) ( $X_1$ )	Temperatura de Hidrólise ( $^{\circ}$ C) $X_2$	Concentração Enzima/ Substrato (%) $X_3$
1	-1 (2)	-1 (40)	-1 (0,1)
2	1 (3)	-1 (40)	-1 (0,1)
3	-1 (2)	1 (50)	-1 (0,1)
4	1 (3)	1 (50)	-1 (0,1)
5	-1 (2)	-1 (40)	1 (0,3)
6	1 (3)	-1 (40)	1 (0,3)
7	-1 (2)	1 (50)	1 (0,3)
8	1 (3)	1 (50)	1 (0,3)
9	0 (2,5)	0 (45)	0 (0,2)
10	0 (2,5)	0 (45)	0 (0,2)
11	0 (2,5)	0 (45)	0 (0,2)

<sup>a</sup> Experimentos foram realizados em ordem aleatória

Os níveis estudados para as variáveis independentes do planejamento utilizado para a obtenção do hidrolisado enzimático de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) foram baseados nas condições de trabalho da enzima Flavourzyme, segundo recomendação de diferentes autores (HOYLE e MERRIT, 1994; BAEK e CADWALLADER, 1995; DINIS e MARTIN, 1996; BENJAKUL e CADWALLADER, 1997; HAMYD et al., 2001 ; GILBERG et al., 2002; CÂNDIDO e SGARBIERI, 2003; NILSANG et al., 2004 ; SLIZYTE et al., 2004).

### **3.2.2.2 Processo de purificação dos carotenóides através de processo químico**

Para efetuar a purificação dos carotenóides foi usado processo químico usando solventes permitidos pela legislação brasileira, tais como o hexano e acetona. Foram pesados 9,5 g da carotenoproteína obtida através do processo enzimático e esta foi submetida à extração química em um balão de três bocas, sendo uma delas para o controle de temperatura com termômetro, a outra para a entrada da haste do agitador (750 rpm) e a terceira para colocar o condensador, com a finalidade de reduzir a evaporação de solvente. Após o término do tempo de extração, a amostra passou por uma filtração, onde o sólido foi descartado. O líquido filtrado foi lavado com uma solução aquosa de 5% de NaCl para que esta arrastasse a acetona. Houve uma separação de fases em funil de separação, onde a fase superior era o hexano com os carotenóides e a fase inferior a solução salina com acetona. Finalmente foi obtido o extrato (hexano e carotenóides) e, determinado seu volume. Este extrato foi armazenado no escuro sob refrigeração. Para este processo, foi adicionada a proporção de 1:1, óleo refinado de girassol ao extrato (hexano e carotenóides) e a mistura foi submetida à evaporação a vácuo com temperatura de 40°C em evaporador rotativo até evaporar a totalidade de hexano e restando a oleoresina com astaxantina.

Na Figura 3.2 pode-se observar o fluxograma utilizado para determinar as melhores condições de extração de astaxantina contida na carotenoproteína obtida pelo processo enzimático.

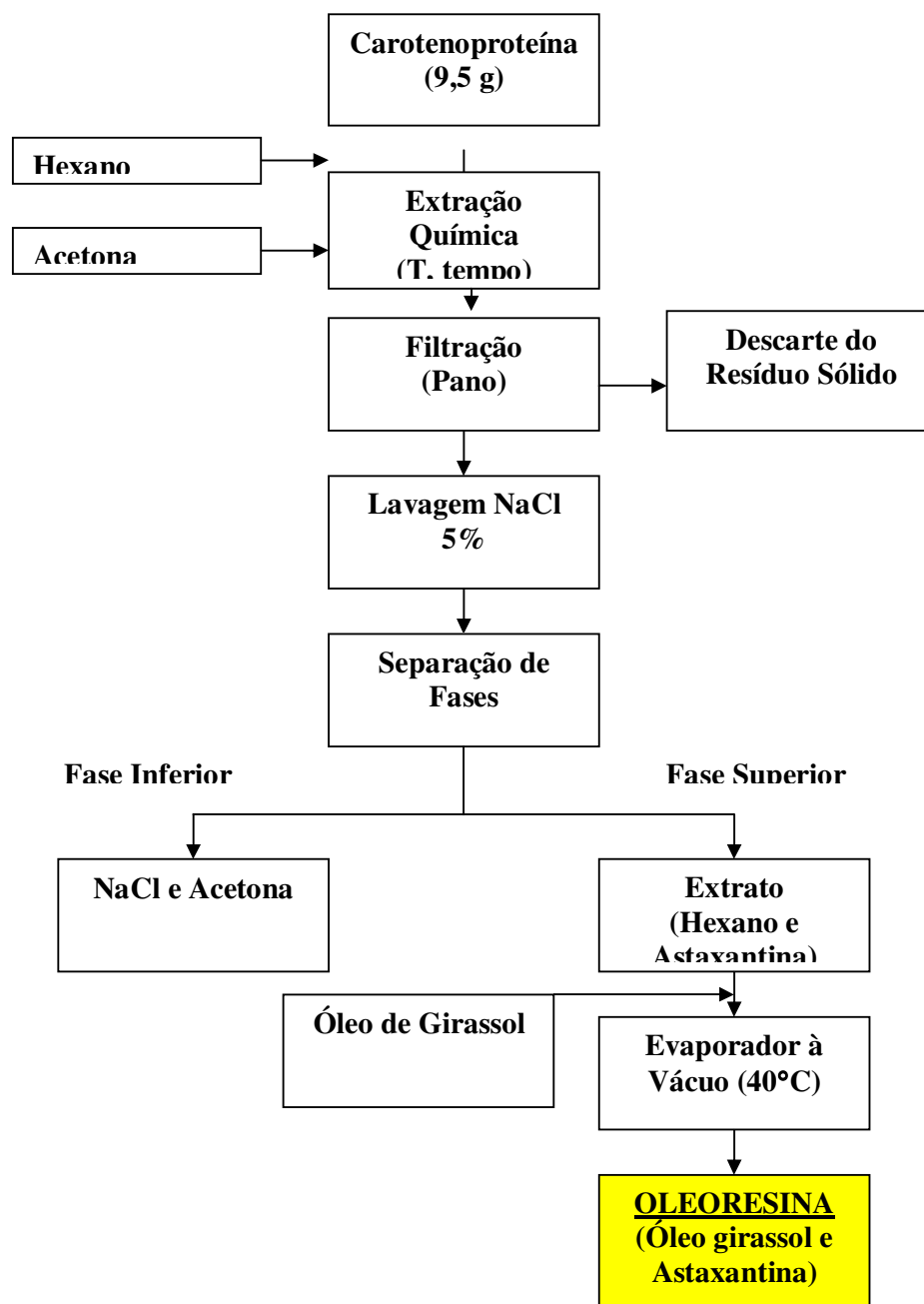


Figura 3.2: Fluxograma utilizado para determinar as condições ótimas de extração dos carotenóides pelo processo químico.

Foi realizado um planejamento experimental para definir as variáveis do processo de extração química que influenciaram na obtenção da maior concentração de astaxantina na carotenoproteína. Optou-se pelo planejamento experimental quadrático do tipo 2<sup>3</sup>, com três variáveis independentes que são o tempo, temperatura de extração química e a proporção de hexano e acetona e os níveis estudados com três pontos centrais e dois pontos axiais apresentadas na Tabela 3.2. Como variável

resposta foi avaliada a concentração de astaxantina, sendo esta determinação realizada em triplicata.

Tabela 3.2: Matriz do planejamento experimental  $2^3$  completo.

Ensaio	Tempo de Extração (min) $X_1$	Temperatura de Extração ( $^{\circ}\text{C}$ ) $X_2$	Proporção de Hexano e Acetona (%) $(X_3)$
1	-1 (120)	-1 (30)	-1 (25)
2	1 (240)	-1 (30)	-1 (25)
3	-1 (120)	1 (40)	-1 (25)
4	1 (240)	1 (40)	-1 (25)
5	-1 (120)	-1 (30)	1 (75)
6	1 (240)	-1 (30)	1 (75)
7	-1 (120)	1 (40)	1 (75)
8	1 (240)	1 (40)	1 (75)
9	$-\alpha$ (80)	0 (35)	0 (50)
10	$+\alpha$ (280)	0 (35)	0 (50)
11	0 (180)	$-\alpha$ (26,6)	0 (50)
12	0 (180)	$+\alpha$ (43,4)	0 (50)
13	0 (180)	0 (35)	0 (50)
14	0 (180)	0 (35)	0 (50)
15	0 (180)	0 (35)	0 (50)
16	0 (180)	0 (35)	0 (50)
17	0	0	0

<sup>a</sup> Experimentos foram realizados em ordem aleatória

Para determinar a diferença significativa na concentração da astaxantina foi usada a análise de variância (ANOVA). Os dados de otimização foram analisados para o efeito de cada fator e suas interações na concentração da astaxantina da carotenoproteína através do teste da ANOVA. Os dados de otimização foram analisados para determinação do coeficiente de regressão. Inicialmente foi efetuado um planejamento experimental linear do tipo  $2^3$  e com três pontos centrais, mas o modelo não foi preditivo. Assim foram adicionados mais dois pontos axiais, analisando um modelo QUADRÁTICO. As variáveis independentes foram temperatura, tempo de extração química e proporção de hexano e acetona e como variáveis dependentes tivemos a concentração de astaxantina conforme mostrado na Tabela 3.4.

## **CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A composição proximal da matéria-prima utilizada é mostrada na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição proximal dos resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).

Composição	Base Úmida (g/100g)	Base Seca (g/100g)
Umidade	79 ± 0,16	-
Cinzas	5,1 ± 0,01	24,3 ± 0,1
Proteína (f=6,25)	9,0 ± 0,08	42,8 ± 0,4
Lipídios	0,5 ± 0,01	2,4 ± 0,05
Fibras	6,4	30,5

\* Experimentos realizados em triplicata

\* O teor de fibras foi determinado pela diferença

Os resultados obtidos durante a caracterização da matéria-prima concordaram com alguns autores como SCARTEZINI e OLEIRO (2004), COSTA (2003), TENUA FILHO e ZUCAS (1987) e GILBERG e STENBERG (2001). Pode-se observar que foi alto, em base seca, o teor de cinzas (24,3%) e fibras (30,5%), o que torna os resíduos de camarão um produto de baixo valor nutritivo (GILBERG e STENBERG, 2001; FANIMO et al., 2000; NUNES, 1976).

## 4.2 OBTENÇÃO DA CAROTENOPROTEÍNA ATRAVÉS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

### 4.2.1 Rendimento, composição em Proteína e Lipídios

Para as variáveis rendimento e teor de proteína foram consideradas apenas as variáveis significativas a um nível de confiança de 95%, já para o teor de lipídios foi usado um nível de significância de 90%. Segundo afirmado pela literatura, um modelo tem significância estatística quando F calculado é pelo menos 3 a 5 vezes maior que o valor F tabelado (KALIL et al., 2000; NETO et al., 2003).

Os resultados de rendimento do processo (%), proteína (%) e lipídios (%) presentes no produto final conforme planejamento fatorial do tipo 2<sup>3</sup> estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Respostas apresentadas pelo rendimento, teor de proteínas e lipídios obtidos a partir da enzima Flavourzyme utilizando a matriz 2<sup>3</sup>

Exp	Tempo Hidrólise (h) X <sub>1</sub>	Temperatura Hidrólise (°C) X <sub>2</sub>	Conc E/S X <sub>3</sub>	% Proteína Y <sub>1</sub>	% Lipídios Y <sub>2</sub>	% Rendimento Y <sub>3</sub>
1	-1(2)	-1(40)	-1 (0,1)	61,1	1,6	6,5
2	1(3)	-1(40)	-1(0,1)	60,5	1,9	6,3
3	-1(2)	1(50)	-1(0,1)	61,3	1,4	6,8
4	1(3)	1(50)	-1(0,1)	60,7	1,7	7,1
5	-1(2)	-1(40)	1(0,3)	68,5	1,8	7,3
6	1(3)	-1(40)	1(0,3)	71,2	1,9	7,5
<b>7</b>	<b>-1(2)</b>	<b>1(50)</b>	<b>1(0,3)</b>	<b>70,9</b>	<b>1,6</b>	<b>9,4</b>
8	1(3)	1(50)	1(0,3)	71	1,5	9,9
9	0(2,5)	0(45)	0(0,2)	64,5	1,6	6,8
10	0(2,5)	0(45)	0(0,2)	64,8	1,6	6,5
11	0(2,5)	0(45)	0(0,2)	64,4	1,6	6,9

A matriz de planejamento utilizada (Tabela 4.2) permitiu a análise de efeitos dos resultados, os quais são apresentados para cada variável resposta.

Através da análise estatística pode-se observar que o maior rendimento obtido para o processo de obtenção da carotenoproteína foi de 9,9%. O maior rendimento da carotenoproteína é atingido com temperatura de 50°C, com concentração de enzima/substrato de 0,3% e com tempo de reação de hidrólise de 3 horas. A maior porcentagem de proteínas foi de 71,2% e foi conseguida com uma temperatura de 40° C, concentração de enzima/substrato de 0,3 % e com um tempo de reação de hidrólise de 3h. Já para o teor de lipídios a menor porcentagem foi de 1,4% com temperatura de hidrólise de 50°C, concentração de enzima/substrato de 0,1% e com tempo de reação de hidrólise de 2 horas.

Os resultados do rendimento da carotenoproteína do resíduo de camarão obtidos são inferiores ao rendimento obtido por SIMPSON e HAARD (1985) que foi de 11,6%, mas CHAKRABARTI (2002) obteve um rendimento do processo menor em relação ao adotado que foi de 4,2%.

O teor de proteína obtido por SIMPSON e HAARD (1985) foi de 58,4%, já no processo adotado foi obtido um teor de proteína que variou de 60,5 a 71,2%, o que indica que foi obtido um teor de carotenoproteína mais expressivo em relação ao processo citado.

O teor de lipídios obtido por CHAKRABARTI (2002) foi de 0,3 % e no processo adotado o teor de lipídios variou de 1,4 a 1,9%, já SIMPSON e HAARD (1985) obtiveram um teor de lipídios de 26,9%, considerado muito alto.

#### 4.2.1.1 Rendimento

O maior rendimento da carotenoproteína foi de 9,9%, conforme as condições do planejamento experimental da Tabela 4.2. Isto concorda com autores como CHAKRABARTI (2002) e SACHINDRA e MAHENDRAKAR (2005) .

Tabela 4.3: Efeito estimado para o rendimento do processamento do resíduo do camarão-rosa processado com a enzima Flavourzyme.

Variáveis	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p
(1) Tempo hidrólise	0,1000000	0,0735980	1,3587324	0,3071797
(2) Temperatura hidrólise	0,7000000	0,0735980	9,5111271	*0,0108744
(3) [E/S]	0,9250000	0,0735980	12,5682751	*0,0062712
Interação (1) com (2)	0,1000000	0,0735980	1,3587324	0,3071797
Interação (1) com (3)	0,0750000	0,0735980	1,0190493	0,4153872
Interação (2) com (3)	0,4250000	0,0735980	5,7746129	*0,0287036

\* Significância ( $p < 0,05$ )

\* Coeficiente de determinação = 0,87767

Nesta tabela de efeitos, pode-se perceber que o tempo de hidrólise, a interação entre o tempo e a temperatura de hidrólise e a interação entre tempo de hidrólise e concentração de enzima e substrato não foram significativos ( $p > 0,05$ ), enquanto que os demais parâmetros foram todos significativos.

Tabela 4.4: Análise de variância para a variável rendimento

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	12,21	3	4,07	14,7200564
Resíduo	1,935454545	7	0,276493506	
Falta de ajuste	1,848787879	5	0,369757576	
Erro Puro	0,086666667	2	0,043333333	
Total	14,14545455	10	1,414545455	

F tabelado = 4,35

Coeficiente de determinação = 0,86317

No caso da hidrólise enzimática de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), apresentou um modelo preditivo para a variável resposta rendimento, pois o valor de F calculado foi superior ao triplo do F tabelado, como

mostra a Tabela 4.4. Sendo o modelo preditivo, podemos traçar a superfície de resposta para analisar os parâmetros adequados para conseguir o melhor rendimento considerável. Assim podemos originar o modelo de equação (Equação 4.1) das variáveis que influenciam no rendimento do processo.

$$\text{Rendimento (\%)} = 7,3636364 + 0,7 \times T_e + 0,925 \times C + 0,425 \times T_e \times C \quad (4.1)$$

Onde:

$T_e$  = Temperatura de hidrólise (°C)

$C$  = Concentração de Enzima e substrato (%)

Desta forma, o modelo foi utilizado na elaboração da superfície de resposta, permitindo a visualização do comportamento da hidrólise enzimática de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) obtido com a enzima Flavourzyme, em função das variáveis que apresentam influência significativa sobre a variável dependente, rendimento, demonstrados nas Figuras 4.1 a 4.6.

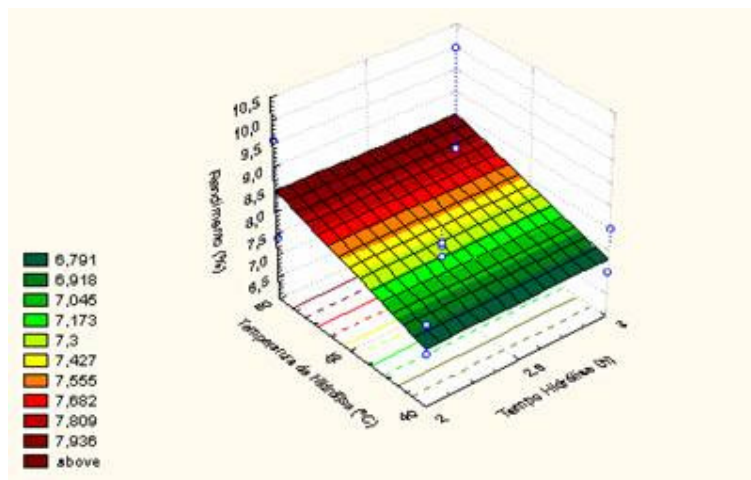


Figura 4.1: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do rendimento.

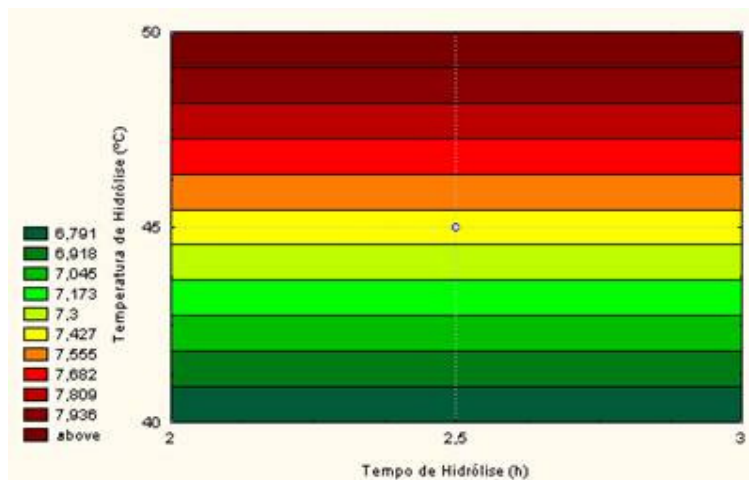


Figura 4.2: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína.

Através da análise estatística foi verificado se as variáveis independentes, tempo de hidrólise e temperatura de hidrólise, exerceram influência sobre a variável dependente, rendimento.

Com a análise estatística foi obtida a correlação de 0,86317 e o modelo também foi preditivo, pois como dito anteriormente o F calculado foi superior ao triplo do F tabelado. Assim foi possível construir a superfície de resposta que proporcionou observar que o maior rendimento consegue-se com uma temperatura de hidrólise maior (50°C) e independe do tempo de hidrólise.

A extração de carotenoproteína do resíduo da casca do camarão marrom (*Metapenaeus monoceros*), usando diferentes enzimas proteolíticas foi estudada por CHAKRABARTI (2002) sendo que a tripsina mostrou uma recuperação máxima de 55% de pigmento carotenóide em 4 horas a 28 °C, e a pepsina e papaína mostraram aproximadamente 50% de recuperação durante o mesmo período.

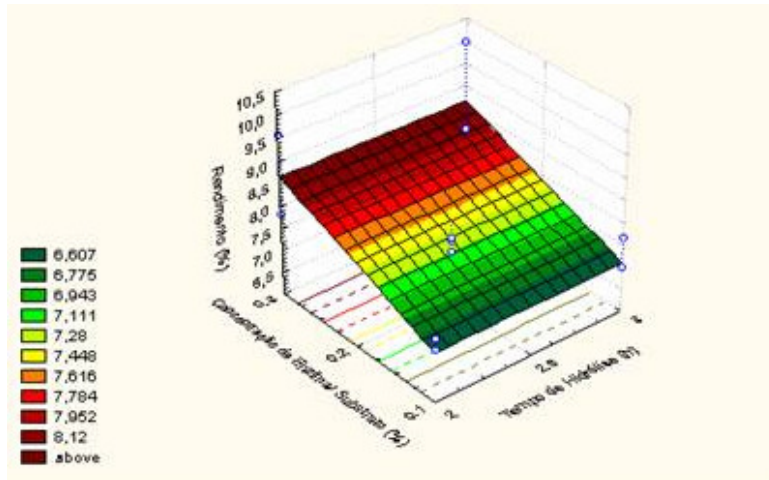


Figura 4.3: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com o tempo de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína..

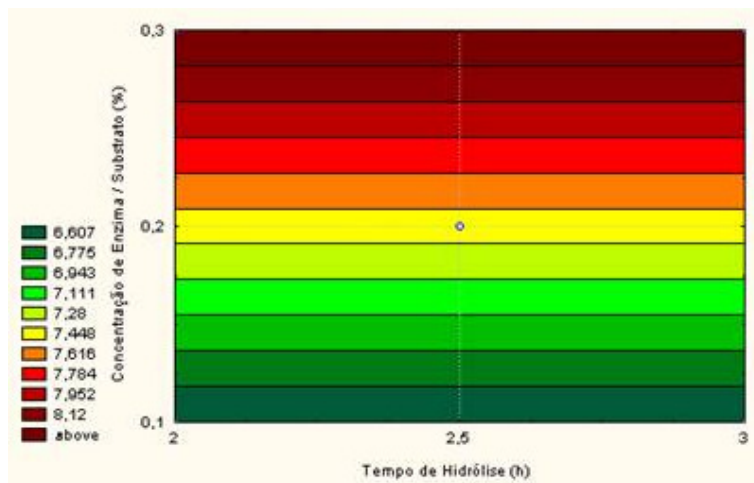


Figura 4.4: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com o tempo de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína.

Nesta análise estatística verificou-se a influência das variáveis, tempo de hidrólise e concentração de enzima e substrato, sobre o rendimento da carotenoproteína. Analisando a superfície de resposta foi possível perceber que o maior rendimento foi com a maior concentração de enzima e substrato (0,3%) e independe do tempo de hidrólise enzimática.

SYNOWIECKI e AL-KHATEEB (2000) obtiveram 30% de rendimento de carotenoproteína na hidrólise enzimática de resíduos do camarão *Crangon crangon*,

utilizando Alcalase, após 4h de reação, a 55°C e com concentração de enzima de 20AUde Alcalase/kg de proteína.

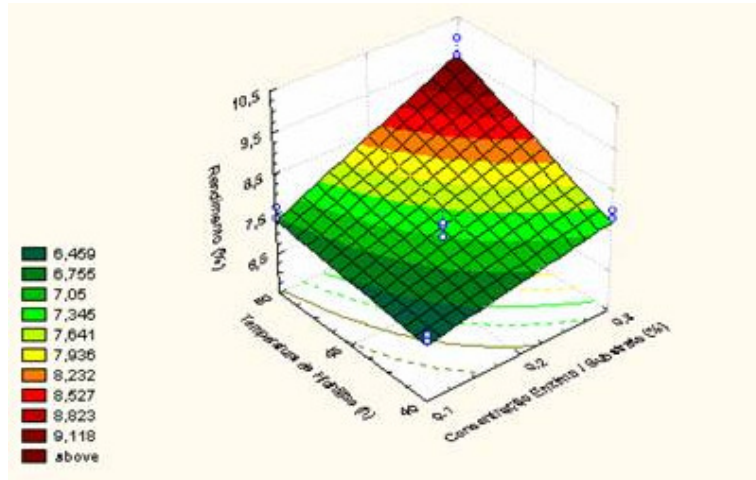


Figura 4.5: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína.

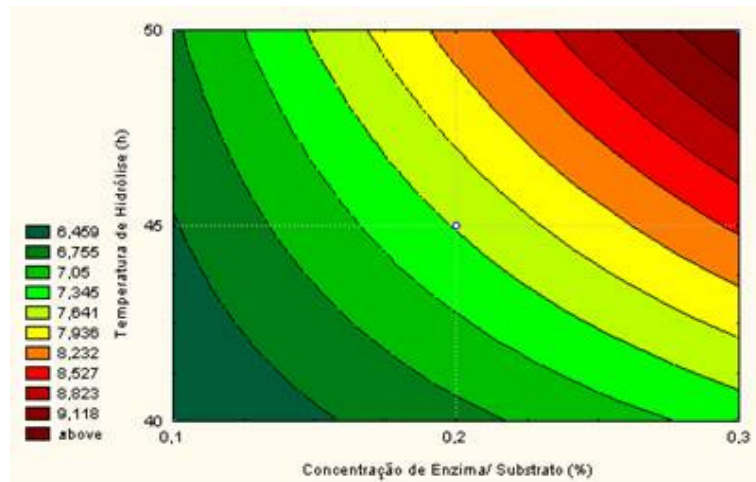


Figura 4.6: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do rendimento do processo de obtenção da carotenoproteína.

Através da análise estatística foi verificada a influência das variáveis independentes, temperatura de hidrólise e concentração de enzima e substrato sobre a variável rendimento, que é a variável dependente. Conforme a superfície de resposta percebeu-se que o maior rendimento é na condição de maior concentração de enzima com substrato (0,3%) e com temperatura mais elevada (50°C).

Efetuada a análise estatística para averiguar quais as variáveis que realmente influenciam sobre o rendimento da carotenoproteína, podemos dizer que apenas a temperatura de hidrólise e a concentração de enzima e substrato exercem influência. A condição ótima de temperatura de hidrólise é de 50° C e a concentração de enzima e substrato é de 0,3 %, para obter um maior rendimento da carotenoproteína, já que o tempo de reação de hidrólise não exerce influência no rendimento.

#### 4.2.1.2. Teor de Proteína

Os efeitos estimados para a porcentagem de proteínas obtida na carotenoproteína obtida através dos resíduos do camarão-rosa estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Efeitos estimados para o teor de proteína dos hidrolisados protéicos do resíduo do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) processados com a enzima

Variáveis	Flavourzyme.			
	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p
(1) Tempo hidrólise	0,2000000	0,0735980	2,7174649	0,1129345
(2) Temperatura hidrólise	0,3250000	0,0735980	4,4158804	*0,0476467
(3) [E/S]	4,7500000	0,0735980	64,5397909	*0,0002400
Interação (1) com (2)	-0,3250000	0,0735980	-4,4158804	*0,0476467
Interação (1) com (3)	0,5000000	0,0735980	6,7936622	*0,0209870
Interação (2) com (3)	0,2250000	0,0735980	3,0571480	0,0924049

\* Significativas ( $p < 5$ )

\* Coeficiente de determinação = 0,98146

Nesta tabela de efeitos, pode-se perceber que o tempo de hidrólise e a interação entre temperatura de hidrólise e proporção de enzima com substrato não foram significativas ( $p > 5$ ), enquanto os demais parâmetros foram todos significativos.



Tabela 4.6: Análise de variância para o teor de proteína.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	184,19	4	46,0475	65,51
Resíduo	4,217272727	6	0,702878788	
Falta de ajuste	4,130606061	4	1,032651515	
Erro Puro	0,086666667	2	0,043333333	
Total	188,4072727	10	18,84072727	

F tabelado = 4,53

Coefficiente de determinação =0,97762

A hidrólise enzimática de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), apresentou um modelo preditivo para a variável proteína, pois o valor de F calculado foi superior ao triplo do F tabelado, como mostra a Tabela 4.6. Sendo o modelo preditivo, pode-se traçar a superfície de resposta para analisar os parâmetros adequados para conseguir um rendimento considerável. Assim pode-se originar o modelo de equação (Equação 4.2) das variáveis que influenciam no teor de proteína da carotenoproteína.

$$\text{Proteína (\%)} = 65,35 + 0,325 \times T + 4,75 \times C - 0,325 \times T \times Te + 0,5 \times T \times C \quad (4.2)$$

Onde:

T=Tempo de hidrólise (°C)

Te= Temperatura de hidrólise (h)

C= Concentração de enzima e substrato (%)

Desta forma, o modelo foi utilizado na construção da superfície de resposta, permitindo a visualização do comportamento da hidrólise enzimática de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) obtido com a enzima Flavourzyme em função das variáveis que apresentam influência significativa sobre a variável dependente, teor de proteína, demonstrados nas Figuras 4.7 a 4.12.

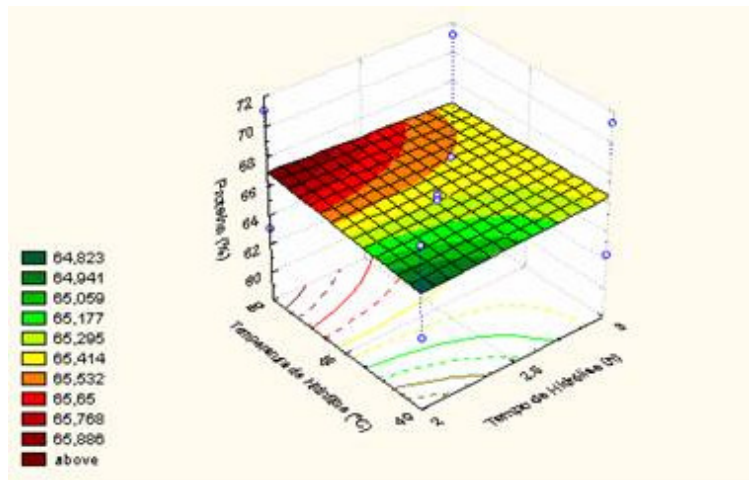


Figura 4.7: Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura de hidrólise com o tempo de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína.

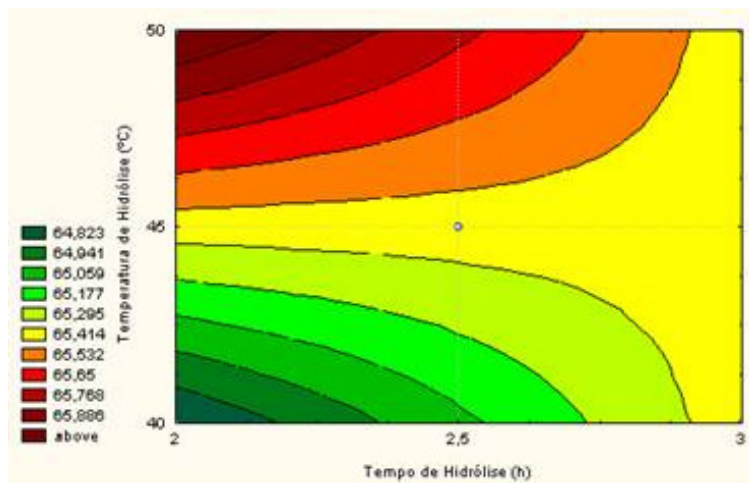


Figura 4.8: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína.

Através da análise estatística foi verificado que as variáveis independentes, tempo de hidrólise e temperatura de hidrólise, exercem influência sobre a variável dependente, teor de proteína.

Com a análise estatística foi obtido uma boa correlação de 0,98146 e o modelo também foi preditivo, pois o F calculado foi pelo menos cinco vezes superior que o F tabelado. Assim foi possível construir a superfície de resposta que permitiu observar que o maior teor de proteína consegue-se com a temperatura de hidrólise mais elevada (50°C) e menor tempo de hidrólise (2 h).

ROMO e ANDERSON (1979) estudaram a extração de proteína em resíduos de Krill e reportaram que um ajuste no pH para o ponto isoelétrico e aquecimento brando fornecem uma recuperação de 93 a 96% da proteína na solução.

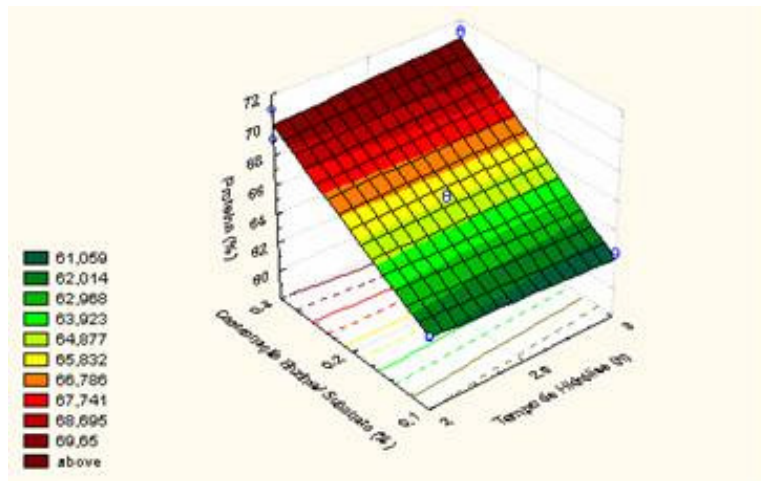


Figura 4.9: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com tempo de hidrólise em função do teor de proteína.

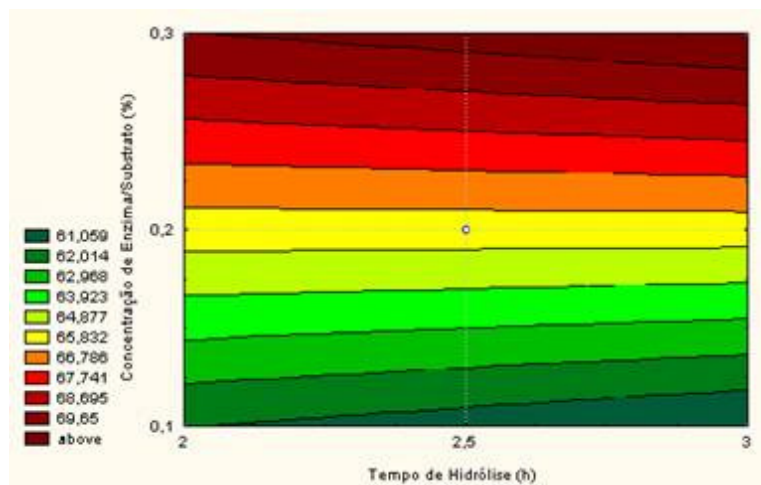


Figura 4.10: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com o tempo de hidrólise em função do teor de proteína.

Nesta análise estatística verificou-se a influência das variáveis, tempo de hidrólise e concentração de enzima e substrato, sobre o teor de proteína na carotenoproteína. Analisando a superfície de resposta foi possível perceber que o maior teor de proteína é na condição de maior concentração de enzima e substrato (0,3%) e independe do tempo de reação de hidrólise.

COSIO et al. (1981) alcançaram 90-95% de proteína solúvel em um tempo de extração de 2h, através de hidrólise enzimática.

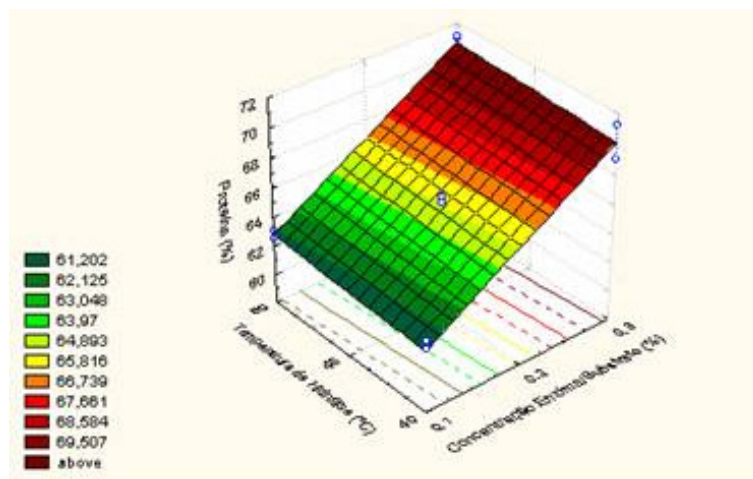


Figura 4.11: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com temperatura de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína.

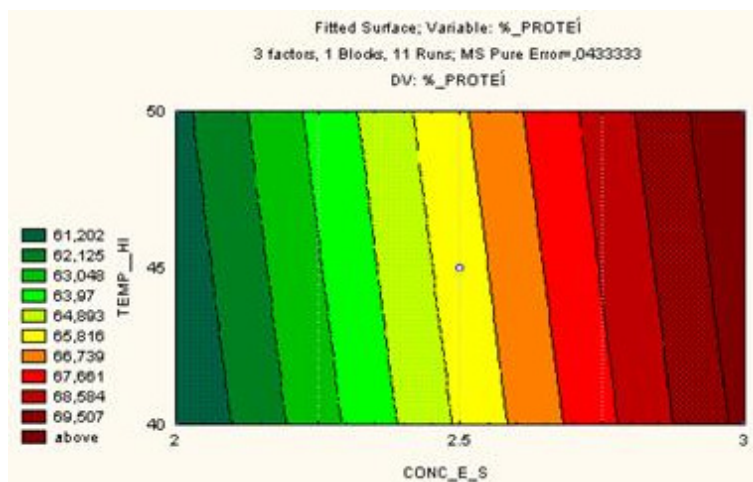


Figura 4.12: Diagrama de contorno do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do teor de proteína do processo de obtenção da carotenoproteína.

Através da análise estatística foi verificada a influência das variáveis independentes, temperatura de hidrólise e concentração de enzima e substrato sobre a variável teor de proteína, que é a variável dependente. Conforme a superfície de resposta percebeu-se que o maior teor de proteína é na condição de maior concentração de enzima com substrato (0,3%) e independe da temperatura.

Isto coincidiu com FERRER et al. (1996) que verificaram a hidrólise ácida de resíduos de camarão e observaram que a condição ótima para extração de

proteína de resíduos de camarão foi em pH 12, por 2h, a 30°C e com uma relação sólido/solvente de 1:20, sendo utilizado como solvente HCl concentrado. O único material obtido pela hidrólise ácida foi a glucosamina.

Efetuada a análise estatística para averiguar quais as variáveis que realmente influenciam sobre o teor de proteína na carotenoproteína, pode-se dizer que apenas a concentração de enzima e substrato exerce influência. A condição ótima é em uma concentração de enzima e substrato de 0,3 % e independe da temperatura e do tempo de hidrólise.

#### 4.2.1.3 Lipídios

A matriz do planejamento experimental para a variável resposta lipídios foi obtida com um nível de significância de 90% como mostrado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7: Efeitos estimados para o teor de lipídios dos hidrolisados protéicos provenientes dos resíduos do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) processados com a enzima Flavourzyme.

Variáveis	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p
(1) Tempo hidrólise	0,0750000	0,02	3,2281655	*0,0320312
(2) Temperatura hidrólise	-0,1250000	0,02	-5,3802759	*0,0057676
(3) [E/S]	0,0250000	0,02	1,0760552	0,3424767
Interação (1) com (2)	-0,0250000	0,02	-1,0760552	0,3424767
Interação (1) com (3)	-0,0750000	0,02	-3,2281655	*0,0320312
Interação (2) com (3)	-0,0250000	0,02	-1,0760552	0,3424767

\* Significativas ( $p < 0,1$ )

\* Coeficiente de determinação = 0,93015

Nesta tabela de efeitos, pode-se perceber que a concentração de enzima e substrato, a interação entre temperatura de hidrólise e tempo de hidrólise e a interação entre temperatura de hidrólise e a concentração da enzima e substrato não foram significativos ( $p > 0,1$ ), enquanto os demais parâmetros foram todos significativos.

Tabela 4.8: Análise de variância para o teor de lipídios presentes na carotenoproteína.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	0,215	3	0,071666667	15,54460094
Resíduo	0,032272727	7	0,00461039	
Falta de ajuste	0,032272727	7	0,00461039	
Erro Puro	0,247272727	10	0,024727273	
Total				

F tabelado = 3,07

Coefficiente de determinação = 0,86949

A hidrólise enzimática de resíduos de camarão-rosa apresentou um modelo preditivo para a variável teor de lipídios, pois o valor de F calculado foi superior ao triplo do F tabelado, como mostra a Tabela 4.8. Sendo o modelo preditivo, pode-se traçar a superfície de resposta para analisar os parâmetros adequados para conseguir um rendimento considerável. Assim pode-se originar o modelo de equação (Equação 4.3) das variáveis que influenciam no teor de lipídios do processo.

$$\text{Lipídios (\%)} = 1,6545455 + 0,075 * T - 0,125 * T_e - 0,0750000 * T * C \quad (4.3)$$

Onde:

T=Tempo de hidrólise (°C)

T<sub>e</sub>= Temperatura de hidrólise (h)

C= Concentração de enzima e substrato (%)

Desta forma, o modelo foi utilizado na construção da superfície de resposta, permitindo a visualização do comportamento da hidrólise enzimática de resíduos de camarão-rosa obtido com a enzima Flavourzyme em função das variáveis que apresentam influência significativa sobre a variável dependente, teor de lipídios, demonstrados nas Figuras 4.13 a 4.18.

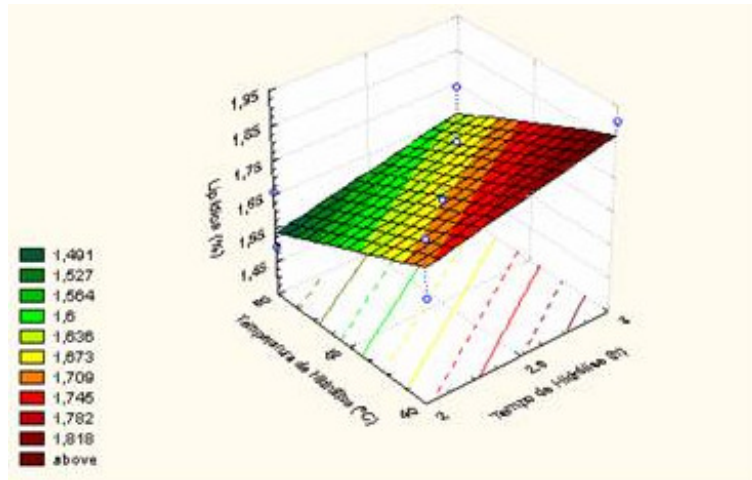


Figura 4.13: Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura de hidrólise com o tempo de hidrólise em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína.

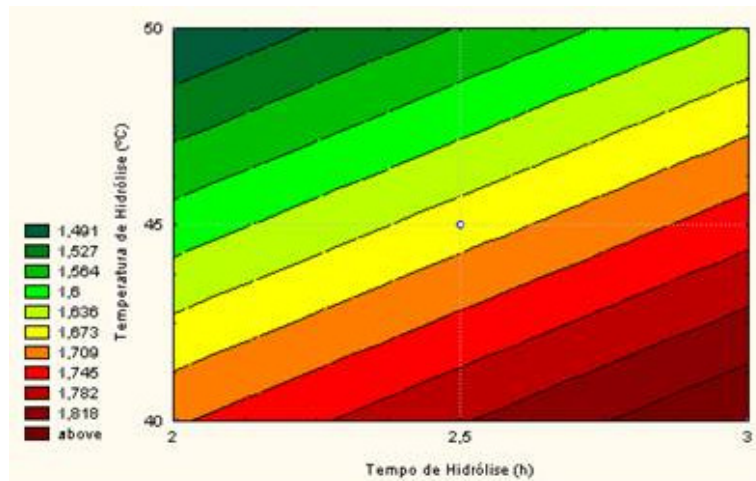


Figura 4.14: Diagrama de contorno do efeito combinado tempo de hidrólise com a temperatura de hidrólise em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína.

Através da análise estatística foi verificado se as variáveis independentes, tempo de hidrólise e temperatura de hidrólise, exercem influência sobre a variável dependente, teor de lipídios.

Com a análise estatística foi obtida uma correlação que foi de 0,93015 e o modelo também foi preditivo, pois como dito anteriormente o F calculado foi o triplo do valor do F tabelado. Assim foi possível construir a superfície de resposta que permitiu observar que o menor teor de lipídios é obtido com o menor tempo de hidrólise (2 h) e com uma temperatura mais elevada (50°C).



GILDBERG e STENBERG (2001) verificaram a recuperação da astaxantina de resíduos de camarão do norte (*Pandalus borealis*) através de hidrólise protéica por 2h, a 40 °C, utilizando Alcalase. Somente em 0,4% da matéria seca havia lipídios extraíveis, sendo que destes, cerca de 60% foram recuperados na fração sedimentada após a centrifugação. Pode-se observar que o teor de lipídios obtido por GILDBERG E STENBERG (2001) foi inferior ao obtido neste estudo, sendo as condições de temperatura e tempo de extração semelhante.

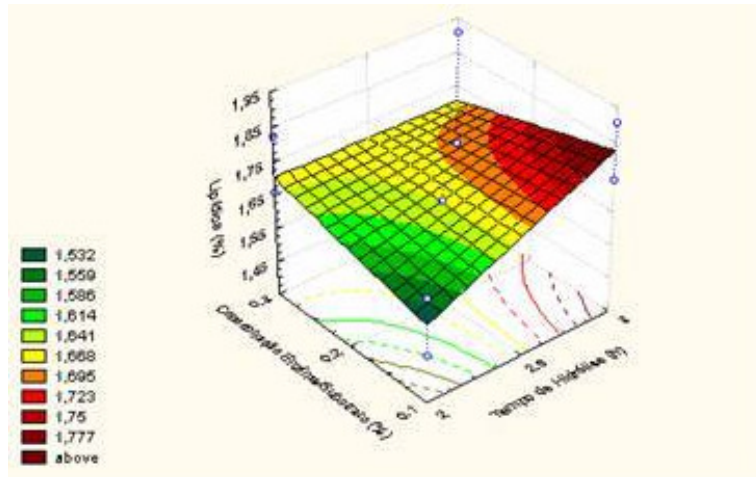


Figura 4.15: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de hidrólise com a concentração de enzima e substrato em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína.

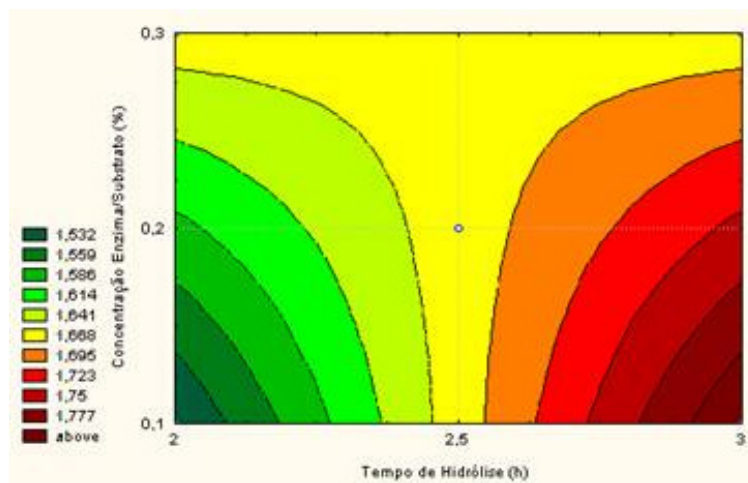


Figura 4.16: Diagrama de contorno do efeito combinado tempo de hidrólise com a concentração de enzima e substrato em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína.



Nesta análise estatística verificou-se a influência das variáveis, tempo de hidrólise e concentração de enzima e substrato, sobre o teor de proteína na carotenoproteína. Analisando a superfície de resposta foi possível perceber que o menor teor de lipídios é com um tempo de hidrólise menor (2 h) e com uma concentração de enzima e substrato menor (0,1%).

Este estudo concorda com SYNOWIECKI e AL-KHATEEB (2000) que estudaram a produção de um hidrolisado protéico durante o isolamento enzimático da quitina produzida a partir de resíduos do camarão *Crangon crangon*, utilizando Alcalase. O hidrolisado protéico recuperado, com um rendimento de 30%, continha 64,3% de proteína, 6,24% de lipídios e 23,4% de cloreto de sódio. Estes resultados foram alcançados após 4h de reação, a 55 °C e com uma concentração de enzima de 20AUde Alcalase/kg de proteína. Pode-se observar que o teor de lipídios obtido neste estudo foi inferior ao obtido por SYNOWIECKI e AL-KHATEEB (2000) verificando que o método em estudo mostra-se satisfatório, em relação à redução do teor de lipídios.

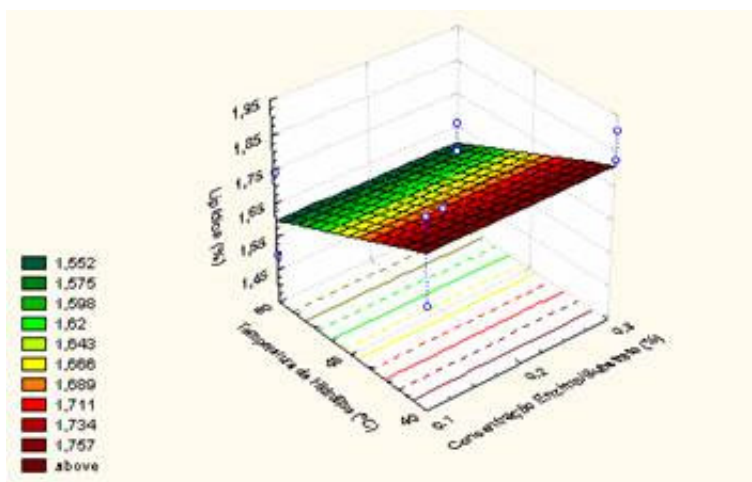


Figura 4.17: Superfície de resposta do efeito combinado da concentração de enzima e substrato com a temperatura de hidrólise em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína.

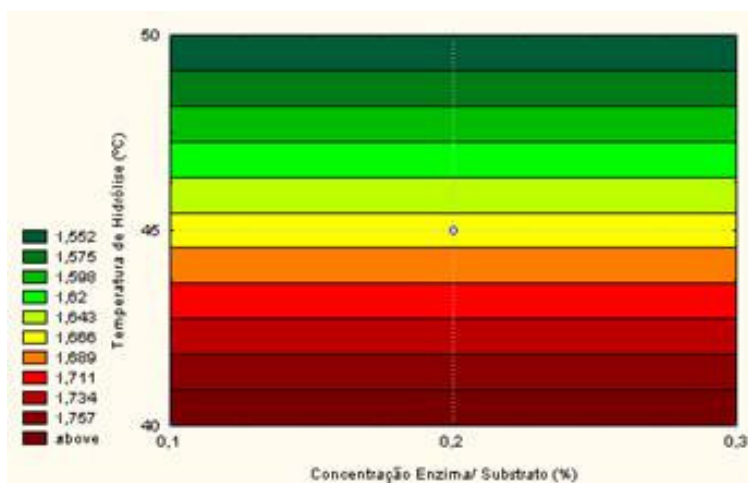


Figura 4.18: Diagrama de contorno do efeito combinado temperatura de hidrólise com a concentração de enzima e substrato em função do teor de lipídios do processo de obtenção da carotenoproteína.

Através da análise estatística foi verificada a influência das variáveis independentes, temperatura de hidrólise e concentração de enzima e substrato sobre a variável teor de lipídios, que é a variável dependente. Conforme a superfície de resposta percebeu-se que o menor teor de lipídios é na condição de maior temperatura (50°C) e independe da concentração de enzima e substrato.

MILICUA et al. (1985) extraíram carotenoproteína da carapaça de lagostas (*Procambarus clarkii*) na presença de Triton X-100 e obtiveram 0,166mg de proteína, 0,833mg de lipídios, 0,032µg de N-acetilglucosamina e 0,178µg de astaxantina por mg de carotenoproteína.

Efetuando a análise estatística para averiguar quais as variáveis que realmente influenciam sobre o teor de lipídios na carotenoproteína, pode-se dizer que a temperatura de hidrólise, o tempo de reação de hidrólise e a concentração de enzima e substrato exercem influência no teor de lipídios na carotenoproteína. A condição ótima para obter um menor teor de lipídios é usando a maior temperatura de hidrólise, de 50°C, concentração de enzima e do substrato de 0,3% e tempo de reação de 2h.

#### 4.2.2 Processo de purificação da astaxantina através de processo químico

Foram consideradas as variáveis significativas a um nível de confiança de 95%. Os resultados de concentração de astaxantina (ppm) presentes na carotenoproteína conforme planejamento fatorial do tipo  $2^3$  está apresentado na Tabela 4.9.

Tabela 4.9: Respostas apresentadas pela concentração de astaxantina utilizando a matriz  $2^3$  a 95% de significância para as variáveis temperatura, tempo de extração química e proporção hexano/acetona.

Experimentos	Temperatura de Extração (°C)	Tempo de Extração (min)	Hex/Acet (%)	Conc. Astax (ppm)
1	-1 (30)	-1 (120)	-1(25)	197,41
2	1 (40)	-1 (120)	-1 (25)	188,02
3	-1 (30)	1 (240)	-1 (25)	190,08
4	1 (40)	1 (240)	-1 (25)	193,76
5	-1 (30)	-1 (120)	1 (75)	138,57
6	1 (40)	-1 (120)	1 (75)	103,12
7	-1 (30)	1 (240)	1 (75)	61,926
8	1 (40)	1 (240)	1 (75)	73,671
9	-1,68 (26,6)	0 (180)	0 (50)	145,28
10	1,68 (43,4)	0 (180)	0 (50)	90,175
11	0 (35)	-1,68 (80)	0 (50)	120,556
12	0 (35)	1,68 (280)	0 (50)	70,129
13	0 (35)	0 (180)	-1,68 (8)	196,26
14	0 (35)	0 (180)	1,68 (92)	63,125
15	0 (35)	0 (180)	0 (50)	86,907
16	0 (35)	0 (180)	0 (50)	91,249
17	0 (35)	0 (180)	0 (50)	89,516

A matriz de planejamento utilizada (Tabela 4.9) permitiu a análise de efeitos dos resultados para a concentração de astaxantina.

Através da análise estatística pôde-se observar que a maior concentração de carotenóides foi de 197,41 ppm conforme as condições do planejamento experimental da Tabela 4.9. A maior concentração de astaxantina foi atingida com

uma temperatura de 30°C, na proporção de Hexano/Acetona de 25% e com tempo de extração química de 2 horas.

SCARTEZINI e OLEIRO (2004) obtiveram uma concentração de carotenóides de 88,02% no resíduo de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) através da extração pelo processo químico.

Considerando os resultados obtidos na Tabela 4.9, observa-se que os resultados destes experimentos concordam com MEYERS (1981), onde foram obtidos 137,3 ppm de astaxantina e 15,8 de astacina.

A Tabela 4.10 apresenta os efeitos estimados para a concentração de astaxantina provenientes do resíduo do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) através da extração química

Tabela 4.10: Efeitos estimados para a variável resposta, concentração de astaxantina presentes na oleoresina.

Variáveis	Efeito	Erro padrão	Valor t	Valor p
Temp. de Extração (°C) (L)	8,940756632	0,592	15,11186334	*0,004350
Temp. de Extração (°C) (Q)	16,2334281	0,652	24,905743	*0,001608
Tempo de extração (min) (L)	14,10193631	0,592	23,83540265	*0,001755
Tempo de extração (min)(Q)	8,302234791	0,652	12,73750219	*0,006107
Hexano/Acetona (%) (L)	45,12008715	0,592	76,26296286	*0,000171
Hexano/Acetona (%) (Q)	20,47286971	0,652	31,41000338	*0,001012
Interação (1) com (2)	7,532698377	0,773	9,748902528	*0,010358
Interação (1) com (3)	2,247776449	0,773	2,909097432	0,100640
Interação (2) com (3)	-13,06309482	0,773	16,90640349	*0,003480

\* Significativas ( $p < 0,05$ )

\* Coeficiente de determinação = 0,85118

Nesta tabela de efeitos, pode-se perceber que a interação entre a temperatura de extração química e a proporção de Hexano e Acetona não foi significativa ( $p > 0,05$ ), enquanto os demais parâmetros foram todos significativos.

Tabela 4.11: Análise de variância para o planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> da extração química da Astaxantina proveniente de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	39396,25074	8	4924,531342	11,47690023
Resíduo	3432,656025	8	429,0820031	
Falta de ajuste	3423,103687	6	570,5172812	
Erro Puro	9,552338017	2	4,776169008	
Total	42828,90676	16	2676,806673	

F tabelado = 3,44

Coeficiente de determinação = 0.85118

A extração química do carotenóide astaxantina proveniente de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) apresentou um modelo preditivo para a variável resposta concentração de astaxantina, pois o valor de F calculado foi superior ao triplo do F tabelado, como mostra a Tabela 4.11. Sendo o modelo preditivo, pode-se traçar a superfície de resposta para analisar os parâmetros adequados para conseguir uma concentração mais elevada de astaxantina. Assim pode-se originar o modelo de equação (Equação 4.4) das variáveis que influenciam no rendimento do processo.

$$\text{Concentração Astaxantina (ppm)} = 87,39 + 8,94Te + 16,23Te^2 - 14,10T + 8,30T^2 - 45,12P + 20,47P^2 + 7,53Te \cdot T - 13,06 T \cdot P \quad (4.4)$$

Onde:

Te = Temperatura de extração química (°C)

T = Tempo de extração química (min)

P = Proporção de Hexano e Acetona (%)

Desta forma, o modelo foi utilizado na construção da superfície de resposta, permitindo a visualização do comportamento de extração química da astaxantina proveniente de resíduos de camarão-rosa em função das variáveis que apresentam influência significativa sobre a variável dependente, concentração de astaxantina, demonstrados nas Figuras 4.19 a 4.24.

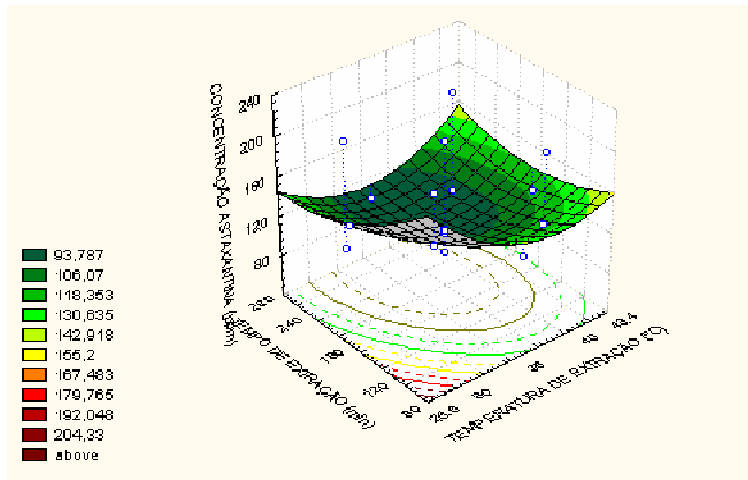


Figura 4.19: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de extração com a temperatura de extração química em função da concentração de astaxantina.

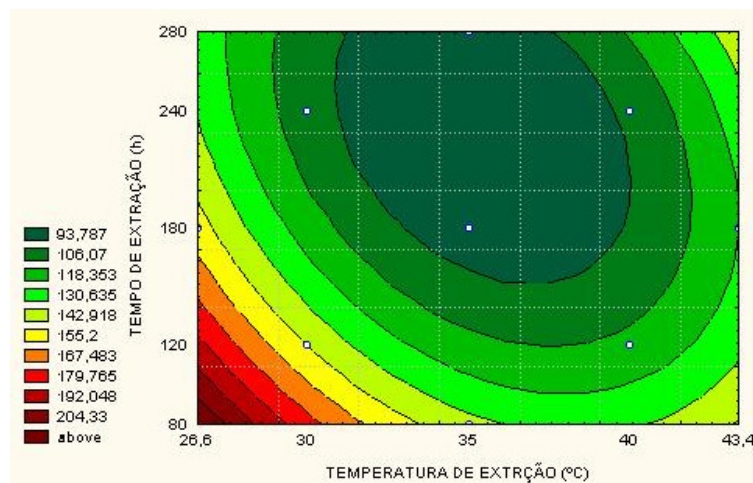


Figura 4.20: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de extração com a temperatura de extração química em função da concentração de astaxantina.

Através da análise estatística foi verificado que as variáveis independentes, tempo de extração e temperatura de extração química, exercem influência sobre a variável dependente, concentração de astaxantina. A concentração de astaxantina na carotenoproteína variou de 61,93 a 197,41 ppm.

Com a elaboração da superfície de resposta pode-se perceber que foi conseguida uma concentração mais elevada de astaxantina com temperatura de extração menor (26,6 – 30 °C) e com um menor tempo de extração química (80 min).

GILDBERG E STENBERG (2001) verificaram a recuperação da astaxantina de resíduos de camarão do norte (*Pandalus borealis*) através de hidrólise protéica por 2h, a 40°C, utilizando Alcalase. Os sedimentos, após centrifugação, continham 1500 ppm de astaxantina, isto é, 10 vezes maior que o conteúdo normal de

astaxantina na carne do camarão de alta qualidade e corresponde à recuperação de cerca de 40% de astaxantina. Estes dados foram bastante superiores em relação à extração de astaxantina quando comparados com os obtidos no presente estudo.

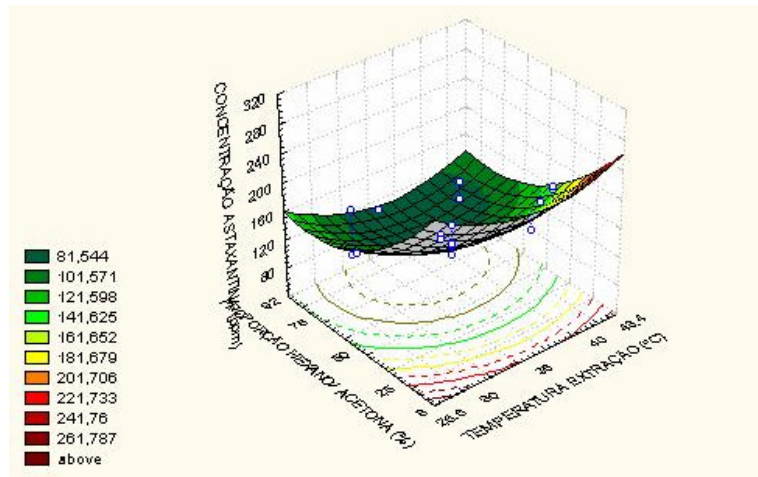


Figura 4.21: Superfície de resposta do efeito combinado da temperatura de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína.

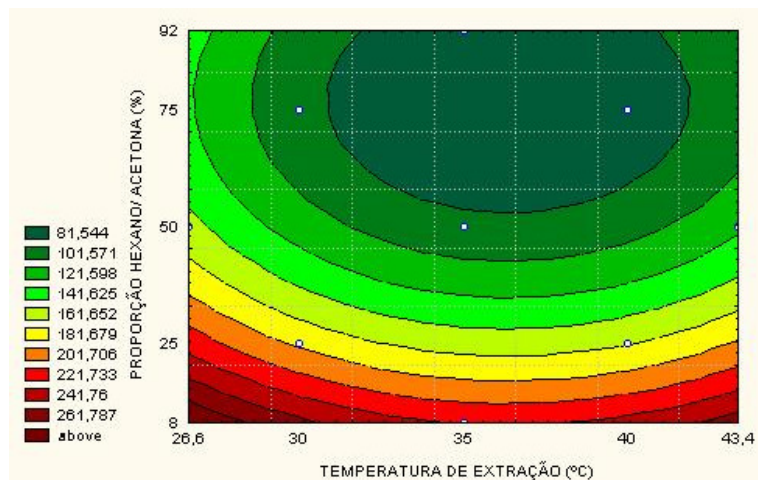


Figura 4.22: Diagrama de contorno do efeito combinado da temperatura de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína.

Através da análise estatística foi verificado que as variáveis independentes, temperatura de extração química e a proporção de hexano e acetona exercem influência sobre a variável dependente, concentração de astaxantina.

Com a construção da superfície de resposta pode-se perceber que é conseguida uma concentração mais elevada de astaxantina com temperatura de extração mais amena (26,6 – 30 °C) e na proporção de hexano e acetona menor (8%).

MEYERS e BLIGH (1981) obteve 137,4 ppm de astaxantina (89,7%) e 15,8 ppm de astaceno (10,3%) de um processo de extração de pigmentos de resíduos de lagostin vermelho (*Procambarus clarkii*), utilizando um sistema ternário composto de éter de petróleo, acetona e água (15:75:10 v/v). Este sistema está baseado nas propriedades de solubilidade entre três solventes, culminando na obtenção de um extrato para quantificação em éter de petróleo após a eliminação de acetona por múltiplas lavagens com água.

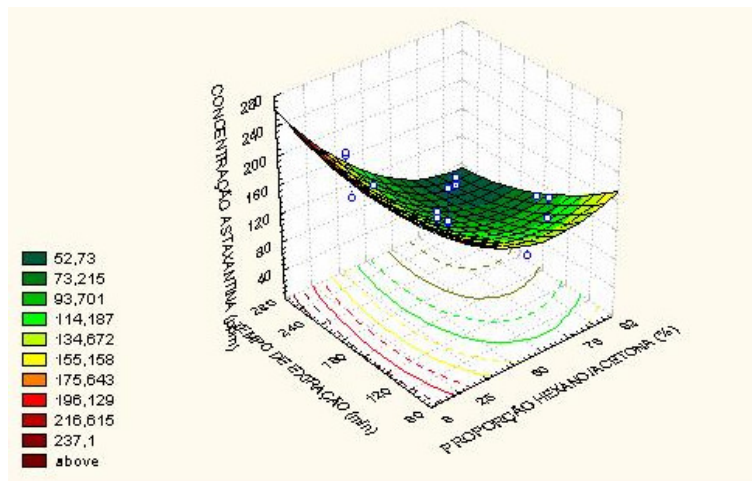


Figura 4.23: Superfície de resposta do efeito combinado do tempo de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína.

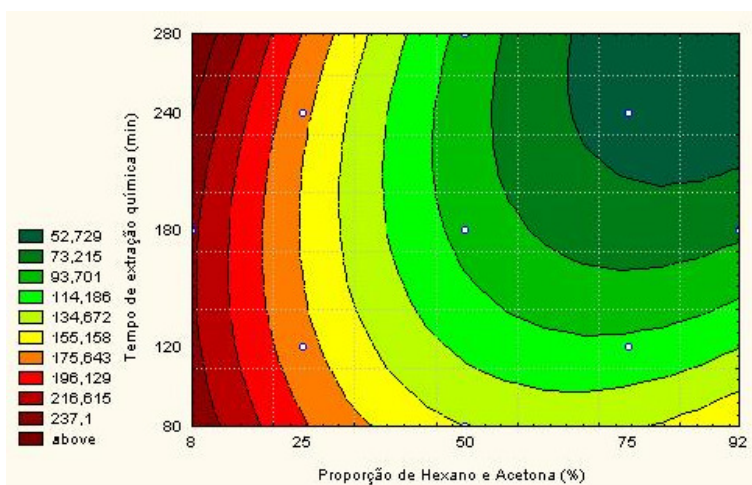


Figura 4.24: Diagrama de contorno do efeito combinado do tempo de extração química com a proporção de hexano e acetona em função da concentração de astaxantina na carotenoproteína.



Nesta análise estatística verificou-se a influência das variáveis, tempo de extração química e proporção de hexano e acetona, sobre a concentração de astaxantina na carotenoproteína.

Analisando a superfície de resposta foi possível perceber que a maior concentração de astaxantina é obtida tanto com um tempo de extração química maior (240 - 280 min) ou com tempo de extração química menor (80 – 120 min), ambos na menor proporção de hexano e acetona (8%).

SIMPSON E HAARD (1985) reportaram a extração de astaxantina utilizando um sistema de benzeno:éter de petróleo:acetona (10:3:2), sendo obtido 116,0mg% de astaxantina na carotenoproteína extraída de resíduos de camarão.

### 4.2.3 Estudo da estabilidade dos carotenóides frente à luz e temperatura

#### 4.2.3.1 Estabilidade à Temperatura

A Tabela 4.12 mostra os resultados referentes ao comportamento da oleoresina quando exposta ao calor.

Tabela 4.12: Análise do efeito do calor sobre a oleoresina de astaxantina.

Tempo (h)	Absorbância	Perda de cor (%)
0	0,6984	0
2	0,6817	2,4
4	0,6784	2,9
8	0,6859	1,8
12	0,5327	23,7
24	0,3883	44,4
48	0,3720	46,7
72	0,3940	43,6

Os dados da Tabela 4.12 encontram-se plotados na Figura 4.25.

$$Y = 0,0001 X^2 - 0,012 X + 0,6696$$

$$R = 0,8841$$

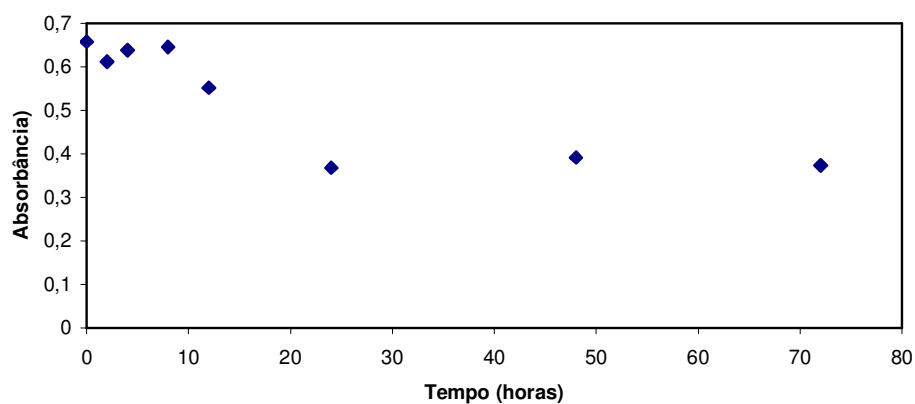


Figura 4.25: Curva de degradação da oleoresina de astaxantina a 105°C.

Observando-se a Tabela 4.12 e a Figura 4.25 foi possível constatar que durante as primeiras 8 horas de exposição à temperatura de 105°C ocorreram pequenas alterações na absorvância. A partir deste ponto houve uma queda com posterior estabilização a partir das 24 horas. Este comportamento demonstra que o corante é estável, quando isolado em óleo de girassol, até um tempo 8 horas. A partir deste ponto observa-se a ação do calor sobre a estrutura do carotenóide através da queda da absorvância. Na tentativa de ajuste dos dados obtidos, a melhor correlação para a polinomial de segunda ordem, foi de 88,41%.

Na molécula da astaxantina observa-se 9 ligações duplas conjugadas. Segundo TEE, 1992, são necessárias, no mínimo 7 ligações duplas conjugadas para que seja possível observar a cor em carotenóides. A deterioração que a alta temperatura causa ao carotenóide pode se refletir na quebra da seqüência de ligações duplas; se a seqüência apresentar 6 ligações duplas conjugadas ou menos não será possível observar cor, isto acarreta uma diminuição no valor da absorvância com o passar do tempo.

#### 4.2.3.2 Estabilidade à Luz

A Tabela 4.13 mostra os resultados referentes ao estudo do comportamento da oleoresina frente à luz.

Tabela 4.13: Valores das absorvâncias obtidas para análise do efeito da luz sobre a oleoresina contendo astaxantina proveniente de resíduos de camarão - rosa.

Tempo	Absorvância	
	Luz	Escuro
0	0,4928	0,4928
1	0,4606	0,4857
2	0,4438	0,4902
4	0,4324	0,4807
7	0,4103	0,4786
10	0,3735	0,4761
15	0,3704	0,4615
21	0,3622	0,4721
30	0,3612	0,4793

A Figura 4.26 mostra um gráfico comparativo dos resultados referentes ao comportamento da oleoresina quando exposta à luz e quando armazenada no escuro sob temperatura ambiente. Observa-se que no escuro, apesar de alguma oscilação inicial, os valores permanecem aproximadamente constantes, o que também é demonstrado pelo valor obtido para o tempo de meia-vida (Tabela 4.14). Já na

exposição à luz, observa-se uma queda de 0,4928 para 0,3502, conforme a Tabela 4.13, evidenciando a degradação da astaxantina frente a este fator.

O tempo de meia-vida para estas condições ficou de 10 dias, conforme a Tabela 4.14. Na tentativa de ajuste polinomial de segunda ordem os dados obtidos para a degradação do carotenóide frente à luz foram,  $y = 0,0002X^2 - 0,0086X + 0,4804$  ( $R^2 = 0,9221$ ).

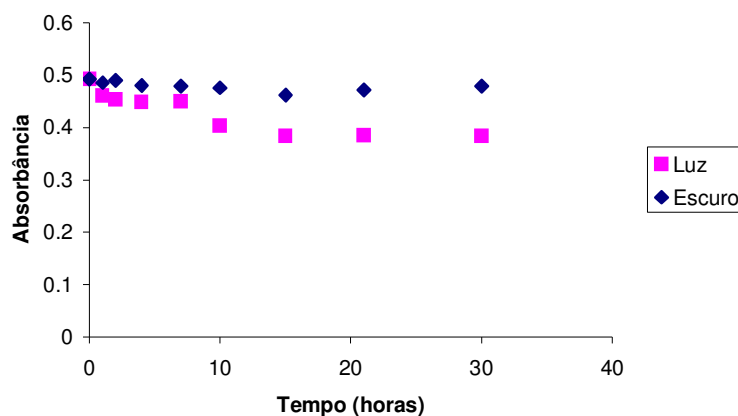


Figura 4.26: Teste de estabilidade (luz e escuro) da oleoresina.

Tabela 4.14: Constantes de velocidade de reação (K) e tempo de meia-vida para o estudo da estabilidade frente à luz.

Amostra	K (dia <sup>-1</sup> )	T <sub>1/2</sub> (dia)
Luz	0,039	17,5
Escuro	0,0049	141

Na Tabela 4.14, observa-se que o valor da constante de degradação (K) para as amostras estocadas no escuro é 8 vezes menor que os das amostras expostas à luz, confirmando os estudos de RODRIGUEZ-AMAYA, 1999; BUCHWALDT e JENCKS, 1968, KUSKOSKI, 2000 e PRENTICE (1994) em que a luz também é um fator relevante no que se refere a carotenóides.

## **CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO**

## 5.1 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um processo para recuperação dos carotenóides presentes nos resíduos de camarão-rosa, misturando uma etapa enzimática inicial com uma etapa química final.

De acordo com o estudo realizado para determinar os parâmetros tecnológicos adequados para obtenção da carotenoproteína a partir dos resíduos provenientes da industrialização do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) foi possível obter um teor de proteína de 70,9%, de lipídios de 1,6% e o rendimento foi de 9,9% em relação ao peso da casca de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).

Os parâmetros da hidrólise enzimática tempo de reação de 3 horas, temperatura de hidrólise de 50°C e a concentração de Enzima/Substrato de 0,3% apresentaram maior rendimento, maior teor de proteínas e menor teor de lipídios.

Depois de obtida a carotenoproteína, foi efetuada a purificação química da astaxantina, através de processo químico. Foi obtida a maior concentração da astaxantina com um tempo de extração química de 120 min, temperatura de extração de 30°C e com uma proporção de Hexano e Acetona de 25%, obtendo um extrato contendo 197,41 ppm de astaxantina.

A oleoresina contendo astaxantina apresentou-se estável ao calor durante 8 horas de exposição à temperatura de 105°C. Já na estabilidade frente à luz, a oleoresina mostrou-se estável por um período de 7 dias.

## **CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, H.L.P.S. de. **A pesca do camarão-rosa na lagoa dos patos: uma análise do esforço de pesca.** Monografia para obtenção do título de Oceanógrafo. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 1997.

ANDERSON, L. K. **Extraction of carotenoid pigment from shrimp processing waste.** US Patent 3906112, 1975.

ANGELUCCI, E. **Corantes para alimentos: legislação brasileira.** In: CORANTES para alimentos. Campinas: ITAL, 1988. p.1-15.

ANTONY, J. L. X.; LEOW, W.; GOH, S. K.; TAN, H. M. **Optimization of a solvent system for the extraction of carotenoids and their distribution in Gou Oizi (*Lycium barbarum*) berries.** Food Chemistry, v.67, p.1-12, 1999.

**ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC).** Official Methods of Analysis. 14<sup>a</sup> ed., v.1, 1995.

BAEK, H. H.; CADWALLADER, K. R. **Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products.** Journal of Food Science, v. 60, p.929-935, 1995.

**BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL.** BNDES apóia exportação de camarões e lagostas no Nordeste. 2001. Disponível em:<<http://www.bndes.gov.br/noticias/financia/not455.asp>>. Acesso em: maio de 2006.

BARRAT, A.; MONTANO, R. **Shrimp heads - a new source of protein.** INFOFISH Mrkg. Dig., 4 (86), 21, 1986.

BAUERNFEIND, J. C. **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: Technological and Nutritional Applications.** New York: Academic Press, 983p., 1981.

BENJAKUL, S.; MORRISSEY, M. T. **Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.45, p.3423-3430,1997.



BERNHARD, K. **Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialization.** In: "Carotenoids: Chemistry and Biology," N. I. Krinsky *et al.* (editors), Plenum Press, New York, p. 337-363, 1990.

BIANCHINI, R.; PENTEADO, M. V. C. **Carotenóides de pimentões amarelos (*Capsicum annuum* L.). Caracterização e verificação de mudanças com o cozimento.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18, n. 3, p.283-288,1997.

BOBBIO, F. O; BOBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos.** 2ª ed. São Paulo: Varela. 234p, 1992.

BRASIL. ANVISA. **Portaria n°540/97, de 27 de outubro de 1997** (DOU de 28/10/97) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. 2002a.  
Acesso em 20/02/2002.

BRASIL. ANVISA. **Decreto no 55.871/65 de 26 de março de 1965.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. 2002b.  
Acesso em 20/02/2002.

BRASIL. ANVISA. **Resolução no 44/77, de 1977** (DOU – Seção I, 01/02/78 e 24/04/78). Disponível: <http://www.anvisa.gov.br>. 2002c.  
Acesso em 20/02/2002.

BRITTON, G. **Structure and properties of carotenoids in relation to function.** The Faseb Journal, v. 9, 1551-1558, 1995.

BUCHWALDT, M.; JENCKS, W. P. **Optical properties of astaxanthin solutions and aggregates.** Biochemistry, v.7, p.834-843, 1968.

BURTON, G. W. **Antioxidant action of carotenoids.** Journal of Nutrition, n.119, p.109-111, 1989.

CALO, P.; GONZÁLEZ, T. **The yeast *Phaffia rhodozyma* as an industrial source of astaxanthin.** Microbiologia, v. 11, p. 386-388, 1995.

CÂNDIDO, L. M. B.; SGARBIERI, V. C. **Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*) myofibrillar proteins: effects on nutritional and**

**hydrophilic properties.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v.83, p.937-944, 2003.

CANO-LOPEZ, A.; SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. **Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod.** Journal of Food Science, v.52, p.503–506, 1987.

CARVALHO, P. R. N. **Potencialidades dos corantes naturais.** Revista Brasileira de Corantes Naturais, v.1, n.1, p.244-245, 1992.

CHAKRABARTI, R. **Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process.** Food Biotechnology, v.16, n.1, p.81-90, 2002.

CHEN, H. M.; MEYERS, S. P. **Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process.** Journal of Food Science, v.47, p.892- 896, 1982.

CHEN, M.; MEYERS, S. P. **Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction.** Journal of Food Science, v.48, p.1516-1520, 1983.

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

CHOY, Y. **The efficient extraction process for the beta-carotene from a wasted perimmon pell.** Proceedings of the Annual Meeting of the Institute of Food Technologist. Anaheim, 2002.

**CLUSTER DO CAMARÃO DO RN.** Dados econômicos: os números da carcinicultura no mundo e no Brasil. 2001. Disponível em: <<http://www.seplan.rn.gov.br/camarao/estatisticacamarao.htm>>.

COLLINS, P.; PLUMBLY, J. **Natural colors: stable future?** Food Technology Europe, v.49, n.2, p.64-70, 1995.

COSIO, G.; FISHER, R.; CARROAD, P. A. **Bioconversion of shellfish chitin waste: waste pretreatment, enzyme production, process and design economic analysis.** Journal of Food Science, v.47, p.901-905, 1981.

COSTA, P. **Processo de Extração química e potencial apresentado pela proteína recuperada da matriz dos exoesqueletos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, 2003.

DAMASCENO, V. **Guerra dos corantes sintéticos ressuscita os naturais.** Química e Derivados, v. 24, n. 250, p.10-21, 1988.

DAVIES, B. H. **Carotenoids.** In: GOODWIN, T. W. Chemistry and biochemistry of plant pigments, v.2. New York: Academic Press, 1976.

DELEVEDOVE, G. C.D. **Genética Populacional do camarão Rosa *Penaeus Paulensis* (Decapoda:Penaeidae) na Região Estuarina na Lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul e no Litoral de Santa Catarina,** 1996. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica). Departamento de Oceanografia, FURG.

DIKE, A. O.; LETTNER, F.; ZOLLITSCH, W. **The supplementation of layers feed with the yeast – *Phaffia rhodozyma* – as pigment carrier.** Archiv für geflügelkunde, v. 5, p. 205-209, 1992.

DINIZ, F. M.; MARTIN, A .M. **Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle.** International Journal of Food Science and Technology, v.31, p.419-426, 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS. EMBRAPA apóia exportação de camarões e lagostas no Nordeste. 2001. Disponível em:<<http://www.bndes.gov.br/noticias/financia/not455.asp>>. Acesso em: maio de 2006.

FANIMO, A. O.; ODUGUWA, O. O.; ONIFADE, A. O.; OLUTUNDE, T. O. **Protein quality of shrimp waste meal.** Bioresource Technology, v. 72, n. 2, p. 185-188, 2000.

FAO/WHO – **Food Additives: Database**. JECFA - Joint Expert Committee on food Additives. 55<sup>th</sup> meetings, 2001.

FERRER, J.; PAEZ, G.; MARMOL, Z.; RAMONES, E.; GARCIA, H.; FARSTER, C. F. **Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell protein from the hydrolysate**. Bioresource Technology, v.57, p.55-60, 1996.

FREITAS, A. S.; BORGES, J. T. S.; COSTA, R. K.; CORNEJO, F. E. P.; WILBERG, V. C. Teores de lipídios totais, ácidos graxos e colesterol em resíduos desidratados de camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) capturado no estado do Rio de Janeiro. **BOLETIM DO CEPPA**. Curitiba, v.20, n.2, p.355-362, 2002.

FREUND, P. R.; WASHAN, C. J.; MAGGION, M. **Natural color for use in foods**. Cereal Foods World, v.33, n.7, p.553-559, 1988.

GALLAGHER, M.; BROWN, W. D. **Composition of San Francisco bay brine shrimp (*Artemia salina*)**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.23, p.630-632, 1975.

GILBERG, A. **Enzymic processing of marine raw materials**. Process Biochemistry, v.28, p.1-15, 1993.

GILBERG, A.; STENBERG, E. **A new process for advanced utilization of shrimp waste**. Process Biochemistry, v.36, p.809-812, 2001.

GILBERG, A.; ARNESE, J. A.; CARLEHOG, M. **Utilization of cod backbone by biochemical fractionation**. Process Biochemistry, v. 38, p.475-480, 2002.

GOODWIN, T. W. **Distribution of carotenoids**. Methods in Enzimology, New York, v. 213, p.167-172, 1992.

HAARD, N. F.; SIMPSON, B. K. **Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry**. In: Fisheries processing: biotechnological applications, Chapman and Hall, London, UK, p.132-154, 1994.

HARA, S.; OMATA, T.; TANAKA, Y.; HIBINO, H.; TOTANI, Y. **Concentration of esterified astaxanthin in euphasid oil**. Journal of Oleo Science, v.50, p.73-76, 2001.

HOYLE, N.; MERRITT, J. H. **Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*)**. Journal of Food Science, v. 59, p.76-79, 1994.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Desembarque de Pescados no Rio Grande do Sul**. CEPERG/RS. Rio Grande: 2002.

INOUE, T.; SIMPSON, K. L.; TANAKA, Y.; SAMESHIMA, M. **Condensed astaxanthin of pigmented oil from crawfish carapace and its feeding experiment**. Bulletin of Japanese Society Science Fish, v.54, p.103-106, 1988.

ISLER, O. **Carotenóids**. Basel: Birkhauser, p.12-25, 1971.

JENSEN, C., BIRK, E., JOKUMSEN, A., SKIBSTED, L, H., AND BERTELSEN, G. **Effect of dietary levels of fat, alpha-tocopherol and astaxanthin on colour and lipid oxidation during storage of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and during chill storage of smoked trout**. *Zeitschrift f. Lebensmittel-Untersuchung u. Forschung A*, 207(3), p.189-196, 1998. Disponível em :< [www.astaxanthin.org](http://www.astaxanthin.org)> Acessado em : 05/10/2005.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. **Astaxanthin from microbial sources**. Critical Reviews in Biotechnology, v.11, n.4, p.297-326, 1991.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. **Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization**. Process Biochemistry, v.35, p.539-550, 2000.

KHACHIK, F.; GOLI, M. B.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J.; LUSBY, W. R. **Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.40, p.390-398, 1992.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. **Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate induced cyst cells of a green unicellular alga *Haematococcus pluvialis***. Applied Environment Microbiology, v.59, p.867-873, 1993.

KRINSKY, N. I. **Antioxidant functions of carotenoids.** Free Radical Biology and Medicine, n.7, p.617-635, 1989.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B. A. **Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (Salmon salar) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture.** Process Biochemistry, v.36, p.131-139, 2000.

KRZECZKOWSKI, R. A. **Fatty acids in raw and processed alaska pink shrimp.** Journal of American Oil Chemistry Society, v.47, p.451-453, 1970

KUSKOSKI, M.; MARQUES, P.; FETT, R. **Estudo comparativo da estabilidade das Antocianinas do Bagaçum Jambolão e da Uva.** Revista Brasileira de Corantes Naturais, v.4, n.1 e 2, p.73-76, 2000.

LIGNELL, A.; NICOLIN, A.; LARSSON, L. H.; INBORR, J. **Method for increasing the production of/in breeding and production animals in the poultry industry.** US Patent 5744502, 1998.

LORENA, W. **Corantes artificiais e pigmentos.** In: CORANTES para alimentos. Campinas: ITAL, p.20-26, 1987.

LORENZ, R. T.; CYSEWSKI, G. R. **Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* as a natural source of astaxanthin trends.** Trends in Biotechnology, v.18, p.160-167, 2000.

MAHER, T. J. **Astaxanthin: Continuing Education Module.** Natural Healing Track, New Hope Institute of Retailing, USA, p.2-6, 2000.

MANGELS, A. R.; HOLDEN, J. M.; BEECHER, G. R.; FORMAN, M. R.; LANZA, E. **Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data.** Journal of the American Diet Association, v.93, 284-296, 1993. Disponível em:<[www.astaxanthin.org](http://www.astaxanthin.org)>Acessado em 08/10/2005.

MARGALITH, P. Z. **Production of ketocarotenoids by microalgae.** Applied Microbiology Biotechnology, v.51, p.431-438, 1999.

MARTIN, A. M.; ACHEAMPONG, E.; PATEL, T. R. **Production of astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* using peat hydrolysates as substrate.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.58, p.223-230, 1993.

MERCADANTE, A. **New carotenoids: recent progress.** Invited Lecture 2. Abstracts of the 12<sup>th</sup> International Carotenoid Symposium, Australia, 1999.

MEYERS, S. P. **Utilization of shrimp processing wastes.** Info Fish Digest, v.4, p.18-19, 1986.

MEYERS, S. P.; CHEN, H. M. **Process for utilization of shellfish waste.** US Patent 4505939, 1985.

MEYERS, S. P.; BLIGH, D. **Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.29, n.3, p.505-508, 1981.

MIKI, W. **Biological functions and activities of animal carotenoids.** Pure Applied Chemistry, v.63, n.1, p.141-146, 1991.

MIKI, W., HOSODA, K., KONDO, K., AND ITAKURA, H. **Astaxanthin-containing drink.** US Patent 10155459, 1998.

MILICUA, J. C. G.; GOMEZ, R.; GARATE, A. M.; MACARULLA, J. M. **A red carotenoprotein from the carapace of the crayfish (*Procambarus clarkii*).** Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.81, n.4, p.1023-1025, 1985.

NETO, B. B.; CARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** Editora UNICAMP. São Paulo, 2003.

NILSANG, S.; LERTSIRI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; ASSAVANIG, A. **Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases.** Journal of Food Engineering, v.70, p.571-578, 2005.

NO, H. K.; MEYERS, S. P. **Utilization of crawfish processing wastes as carotenoid, chitin and chitosan source.** Journal of the Korean Society in Food Nutrition, n.21, p.319-326, 1992.

NUNES, M. L. **Elaboração de farinha a partir de resíduos de camarão.** Boletim de Ciências do Mar, v.28, p.37-42, 1976.

OMARA-ALWALA, T. R.; CHEN, H. M.; ITO, Y. M.; SIMPSON, K. L.; MEYERS, S. P. **Carotenoid pigment and fatty acid analysis of crawfish oil extracts.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.33, p.260-263, 1985.

ONODENALORE, A. C.; SHAHIDI, F. **Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*).** Journal of Aquatic Food Products Technology, v.5, p.43-59, 1996.

ONG, A. S. H.; TEE, E. S. **Natural sources of carotenoids from plants and oils.** Methods in Enzymology, v.213, p.142-147, 1992. Disponível em: <[www.astaxanthin.org](http://www.astaxanthin.org)>Acessado em: 25/08/2005.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. **Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview.** Methods in Enzymology, v.13, p.403-420, 1992.

PETO, R.; DOLL, R.; BUCKLEY, J. D.; SPORN, M. B. **Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?** Nature, v.290, p.201-208, 1981.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação de métodos de obtenção e da estabilidade de pigmentos de sementes de urucum (*Bixa orellana* L).** Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 132 p., 1995.

PRENTICE, C. H. **Obtenção e avaliação de Bixina a partir do extrato de Urucum (*Bixa orellana* L).** Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 135p., 1994.



REYNDERS, M. B.; RAWLINGS, D. E.; HARRISON, S. T. L. **Studies on the growth, modeling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during feedbatch cultivation.** Biotechnology Letters, v.18, n.6, p.649-654, 1996.

**RIO GRANDE DO SUL.** Assembléia Legislativa do Estado. Subcomissão Mista de Pesca e Piscicultura. Comissão de Agricultura, pecuária e Cooperativismo. Comissão de Economia e Desenvolvimento. Relatório 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenóides: propriedades e aplicações.** In. Carvalho, P.R.N (coord). Seminário: Corantes para Alimentos. Campinas. ITAL, 47, 1988.

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. **A guide to carotenoid analysis in foods.** Washington, International Life Sciences Institute, 64p., 1999.

ROMO, C. R.; ANDERSON, C. G. **Determination of optimum parameters for protein isolation from Krill waste products.** Journal of Food Science, v.44, p.1425-1429, 1979.

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

SCARTEZINI, J.; OLEIRO, V. **Obtenção, caracterização e avaliação do carotenóide astaxantina proveniente dos resíduos do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).** Projeto apresentado para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 2004.

SCHOEMAKER, R. **Shrimp waste utilization.** Infofish Technical Handbook. v. 4. Info Fish: Malásia, 1991.

SHAHIDI, F.; METUSALACH, M.; BROWN, J. A. **Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture.** CRC Critical Review of Food Science, v.38, p.1-67, 1998.

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

SHIMARA, K; K. IKEDA.M. **A new of crustacean chitin using proteolytic bacterium (*P. maltophilia*).** In the proceeding of the second international conference of Japanese Society of chitin & chitosan; Hirano.S., Tokura.S., Eds.; Sapporo: Japan, p.10-11, 1982.

SIMPSON, K. L. **Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A.** Proceedings of the Nutrition Society, Cambridge, v.42, p.7-17, 1984.

SIMPSON, B. K.; HAARD, N. **The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp waste.** Journal of Applied Biochemistry, v.7, p.212-222, 1985.

SLIZYTE, R.; DAUKSAS, E.; FALCH, E.; STORRO, I.; RUSTAD, T. **Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products.** Process Biochemistry, v.40, p.2021-2033, 2004.

SPINELLI, J.; MAHNKEN, C. **Carotenoid deposition in pen reared salmonids fed diets containing oil extracts of red carb (*Pleuromnocoedes planipes*).** Aquaculture, v.13, p.213-216, 1978.

STOREBAKKEN, T., NO, H. K. **Pigmentation of rainbow trout.** Aquaculture, v.100, p.209-229, 1992.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. **The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards.** Food Chemistry, v.68, p.147-152, 2000.

TEE, E. S. **Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.31, p.103-163, 1992.

TENUTA FILHO, A.; ZUCAS, S. M. **Cefalotórax de Camarão Rosa. VI Caracterização Químico-nutricional do resíduo obtido após a recuperação da proteína.** Boletim do SBCTA, v.21, p.163-170, 1987.

TERÃO, J. **Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution.** Lipids, v.24, p.659-661, 1989.

TORRISEN, O. J.; CHRISTIANSEN, R. **Requeriments for carotenoids in fish diets.** J. Appl. Ichthyol, v.11, p.225-230, 1995. Disponível em: <[www.astaxanthin.org](http://www.astaxanthin.org)> Acessado em: 22/08/2005.

TORRISEN, O. J. **Strategies for salmonid pigmentation.** J. Appl. Ichthyol, v.11, p.276-281, 1995.

TORRISON, O. J.; TIDEMAN, E.; HANSEN, F.; RAA, J. **Ensilaging in acid - a method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by- products and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*).** Aquaculture, v.26, p.77-83, 1981.

TRIGUEIRO, I. N. S.; PENTEADO, M. V. C. **Teores de alfa e beta caroteno e atividade próvitamínica A de óleos de dendê brasileiros.** R. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo, São Paulo, v.28, n.1, p.61-74, 1992.

TURUJMAN, S. A.; WAMER, W. G.; WEI, R. R.; ALBERT, R. H. **Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin.** Journal of AOAC International, v.80, n.3, p.622-632, 1997.

YAMAGUCHI, K.; MURAKAM, M.; NAKANO, H.; KONOSU, T.; YAMAMOTO, H.; KOSATA, M.; HATA, K. **Supercritical carbon dioxide extraction of oil from Antarctic Krill.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.34, p.904- 907, 1986.

YUEN, J. P.; CHEN, F. **Chromatographic separation and purification of trans-isomers from the extracts of *Haematococcus pluvialis*.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.46, p.1952-1956, 1999.

ZAKARIA, Z.; HALL, G. M.; SHAMA, G. **Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recover.** Process Biochemistry, v.33, n.1, p.1-6, 1998.