

**Quantificação de astaxantina e  
 $\alpha$ -tocoferol em lagostim *Procambarus clarkii* e  
seus subprodutos por UHPLC-DAD e  
determinação da sua actividade antioxidante**

Patrícia Manuela Nunes Ricardo

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em  
Segurança Alimentar**

Orientada por:

**Professor Doutor Fernando Jorge Ramos** – Professor Associado na Faculdade de Farmácia na Universidade de Coimbra.

**Doutora Ana Teresa Sanches Silva** – Investigadora Auxiliar no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (Lisboa).

**Setembro 2013**

**Universidade de Coimbra**

“ Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende da nossa vontade e perseverança.” (Albert Einstein)



## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fernando Ramos o meu agradecimento por ter aceite orientar esta dissertação, pela disponibilidade, pelos comentários dirigidos ao trabalho sempre oportunos e construtivos e pelos conhecimentos científicos transmitidos ao longo do percurso do curso de Mestrado.

À Doutora Ana Sanches Silva, o meu especial agradecimento por me ter dado a oportunidade de trabalhar com este tema tão desafiante, por toda a disponibilidade, pelos valiosos conhecimentos científicos transmitidos e o apoio na execução do trabalho experimental, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Conceição Castilho o meu profundo agradecimento pela partilha dos seus valiosos conhecimentos, pelas sugestões pertinentes, pela disponibilidade que sempre demonstrou desde o início deste trabalho e pela simpatia.

À Doutora Helena Soares Costa e à Doutora Maria Antónia Calhau, do Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, o meu agradecimento pela forma como me acolheram no INSA e pela abertura dos meios e técnicas necessárias à realização desta dissertação.

Agradeço a todos os profissionais do Departamento de Alimentação e Nutrição, que tornaram este trabalho possível.

A todos aqueles que trabalharam comigo no Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em especial, à Rute, Patrícia, Andreia, Diana e ao Ricardo, por todo o apoio e pela amizade e carinho transmitidos.

Ao Sérgio, o meu profundo agradecimento pela força, carinho, amor incondicional e por todo o apoio ao longo desta fase.

Aos meus pais e irmãos, a quem dedico esta tese, pelo amor incondicional, pelos valores que me inculcaram e fizeram de mim a pessoa que sou hoje. Obrigada por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

## RESUMO

O lagostim vermelho *Procambarus clarkii* é nativo da região centro-sul dos EUA e do nordeste do México. Este crustáceo possui várias características que fazem dele uma espécie com grande carácter invasivo, devido a características de reprodução (taxa de crescimento elevada, alta fecundidade, maturidade precoce, várias gerações num ano), bem como características de plasticidade ecológica (tolerância a diversas condições ambientais e a diversos recursos alimentares).

A orizicultura tem sofrido sérios danos com o aparecimento desta espécie invasora, visto que o seu comportamento escavatório provoca a destruição de diques e fugas de água nos arrozais, assim como, dificulta a sobrevivência dos rebentos de arroz. Contudo, é importante estudar a composição desta matriz no que diz respeito aos seus compostos bioactivos, com potenciais benefícios para a saúde, nomeadamente o seu conteúdo em astaxantina, por forma a encontrar aplicações na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica. A astaxantina é o carotenóide predominante em crustáceos da ordem Decapoda, sendo um dos antioxidantes naturais mais poderosos e economicamente valiosos devido às suas funções biológicas.

O objectivo deste trabalho foi determinar o teor da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol no lagostim *P. clarkii* inteiro e seus subprodutos, cru e cozido, por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UHPLC) acoplada ao detector de diodos (DAD) e comparar a actividade antioxidante *in vitro* do lagostim *P. clarkii*, camarão selvagem e de aquacultura (*Penaeus sp.*), através de ensaios do radical DPPH<sup>•</sup> e do radical ABTS<sup>•+</sup> expresso em TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox<sup>®</sup>).

Na determinação da capacidade antioxidante *in vitro*, pelos dois métodos verificou-se que o camarão selvagem foi a amostra com maior actividade antioxidante, seguido-se o camarão de aquacultura e o lagostim *P. clarkii*. Contudo, pelo método ABTS obtiveram-se melhores resultados de actividade antioxidante para todos os extractos comparativamente ao método DPPH. Uma das possíveis causas é a interferência do espectro de absorção dos carotenóides com o do radical DPPH<sup>•</sup> a 517 nm.

Relativamente à metodologia aplicada na quantificação dos analitos, além do lagostim inteiro, foram analisados individualmente o cefalotórax, o exoesqueleto e a parte edível, antes e após cozedura. As amostras (0,25g) foram extraídas com 5 mL de metanol. A separação cromatográfica foi obtida usando uma pré-coluna (UPLC<sup>®</sup> BEH, 2,1 x 5 mm,

partículas de 1,7  $\mu\text{m}$ ) e uma coluna (UPLC<sup>®</sup> BEH, 2,1x50 mm, partículas de 1,7  $\mu\text{m}$ ) a 20 °C. A detecção da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol foi monitorizada a 480 nm e a 294 nm, respectivamente. A fase móvel utilizada foi um gradiente de fase móvel A [diclorometano/metanol com 0,05 M de acetato de amónio /acetonitrilo 5:20:75 (v/v/v)] e de fase móvel B (água ultrapura), com um fluxo de 0,5 mL/min. O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$ .

O método usado para determinar a astaxantina e o  $\alpha$ -tocoferol provou ser simples, rápido, selectivo e permitiu uma boa resolução a baixos níveis de detecção. Apresentou um limite de quantificação (LQ) de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  para a astaxantina e de 0,6  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\alpha$ -tocoferol. Obtiveram-se boas linearidades para os dois analitos, nomeadamente, um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9991 para a astaxantina e de 0,9994 para o  $\alpha$ -tocoferol. O processo de extracção da astaxantina apresentou bons resultados de recuperação nos níveis de concentração estudados, nomeadamente de 97%  $\pm$  6% no exoesqueleto cozido, 99%  $\pm$  7% no cefalotórax cozido e 89%  $\pm$  7,2% no lagostim inteiro cozido. Relativamente à precisão intra-dia, obteve-se valores de (RSD%)  $\leq$  5% para a astaxantina e para o  $\alpha$ -tocoferol (n=3). No caso do  $\alpha$ -tocoferol, obteve-se um RSD (%)  $\leq$  10 para a precisão inter-dia, nas amostras cruas (n=9).

Em ambos os tipos de amostra (cru e cozido), o exoesqueleto obteve a concentração de astaxantina mais elevada, seguido do cefalotórax e da parte edível. As amostras de exoesqueleto cozidas evidenciaram uma coloração mais intensa (30,5  $\pm$  1,2 de astaxantina/g), pois o aumento da temperatura provoca a desnaturação das carotenoproteínas levando à libertação da astaxantina. No caso do  $\alpha$ -tocoferol, o cefalotórax foi o componente com maior concentração (58,6  $\pm$  1,6  $\mu\text{g/g}$ ). Sendo que, o processo de cozedura provocou uma diminuição considerável na concentração de  $\alpha$ -tocoferol em todas as amostras.

Dos resultados obtidos pode ser concluído que o lagostim invasor *Procambarus clarkii* pode ser considerados uma boa fonte natural de astaxantina, sendo um poderoso antioxidante, com inúmeras aplicações na tecnologia alimentar e na nutrição humana e animal.

## ABSTRACT

The red crayfish *Procambarus clarkii* is native to the south-central USA and north-eastern Mexico. This crustacean has several characteristics that make it an invasive species due to reproduction characteristics (high growth rate, high fecundity, early maturity, several generations in a year), as well as ecological plasticity characteristics (tolerance to different environmental conditions and several resources food). The rice production has suffered serious damage with the appearance of this invasive species, because of their excavatory behavior resulting in destruction of levees and loss of water from fields, as well as hinders the survival of the rice shoots.

However, it is important to study its composition, namely in bioactive compounds, with potential human health benefits, in particular astaxanthin content, to find possible profit applications for the food, cosmetics and pharmaceutical industries. Astaxanthin is the predominant carotenoid in crustaceans of the order Decapoda, one of the most powerful natural antioxidant and economically valuable because of their biological functions.

The aim of the present work was to determine the astaxanthin and  $\alpha$ -tocopherol content of crayfish *P. clarkii* and its by-products, raw and cooked, by Ultra High performance Liquid Chromatography (UHPLC) coupled with diode array detection (DAD). Compare antioxidant activity *in vitro* in the crayfish *P. clarkii*, wild and farmed shrimp (*Penaeus sp.*) by DPPH<sup>•</sup> radical scavenging activity and ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity (Trolox<sup>®</sup> equivalence antioxidant capacity) assays.

All the analyzed samples revealed antioxidant activity by the two methods, but wild shrimp showed the highest antioxidant activity, followed farmed shrimp and crayfish *P.clarkii*. However, antioxidative compounds in all extracts are shown to scavenge ABTS<sup>•+</sup> radical at higher level compared to DPPH<sup>•</sup> radical, one possible cause is the absorption spectrum interference of carotenoids with the DPPH at 517 nm.

Regarding the methodology applied for the quantification of analytes, besides the whole crayfish, head, exoskeleton and meat have also been analysed, before and after boiling. Samples (0.25g) were extracted with 5 mL of methanol. The chromatographic separation was achieved using a vanguard pre-column (UPLC<sup>®</sup> BEH, 2.1 x 5 mm, 1.7  $\mu$ m particle size) and a column (UPLC<sup>®</sup> BEH, 2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu$ m particle size) at 20 °C. Astaxanthin and  $\alpha$ -tocopherol detection was monitored at 480 nm and 294 nm, respectively. The mobile phase is a gradient of mobile phase A [dichloromethane/methanol with 0.05 M ammonium acetate

/acetonitrile 5:20:75 (v/v)] and mobile phase B (ultrapure water) with a flow rate of 0.5 mL/min. A volume of 10  $\mu$ L was injected into the UHPLC.

The method used to determine the astaxanthin and  $\alpha$ -tocopherol proved to be simple, rapid, selective and allows good resolution at low detection levels. The method presented a limit of quantification (LQ) of 0.05  $\mu$ g / mL for astaxanthin and 0.6  $\mu$ g / mL for  $\alpha$ -tocopherol. Linearity was good for both analytes, namely a coefficient of determination ( $r^2$ ) of 0.9991 for astaxanthin and 0.9994 for  $\alpha$ -tocopherol.

The extraction process of astaxanthin showed good recovery results for the concentration levels studied, namely 97%  $\pm$  6% for cooked exoskeleton, 99%  $\pm$  7% for cooked cephalothorax and 89%  $\pm$  7.2% for cooked whole crayfish. Regarding the intra-assay precision, the relative standard deviation (RSD %) value was  $\leq$  5% for the astaxanthin and  $\alpha$ -tocopherol (n=3). For the  $\alpha$ -tocopherol the relative standard deviation (RSD %) value of intra-assay was  $\leq$  10 %, in raw samples (n=9).

In both types of samples (raw and cooked crayfish), the exoskeleton had the highest concentration of astaxanthin, followed by the head and then, by far, by the crayfish meat. The cooked exoskeleton samples showed a more intense red coloration (30.5  $\pm$  1.2  $\mu$ g astaxanthin/g), caused by the release of astaxanthin from the carotenoproteins by denaturation due to increased temperature.

In the case of  $\alpha$ -tocopherol, the carapace was the component with the highest concentration (58.6  $\pm$  1.6 mg / g). The cooking process caused a considerable decrease of  $\alpha$ -tocopherol concentration in all samples.

These results suggest that invasive crayfish *Procambarus clarkii* can be considered a good natural source of astaxanthin, which is a potent antioxidant with a variety of applications in food technology and human/animal nutrition.

## ABREVIATURAS

**µg/g** - micrograma por grama

**µg/mL** - micrograma por mililitro

**µm** - micrometro

**ABTS** - Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico

**ABTS<sup>•+</sup>** - Radical ABTS

**ATX** - Astaxantina

**BHT** - Hidroxitolueno butilado

**C<sub>18</sub>** - Octadecilsilana

**DAD** - Detector de diodos

**DDA** - Dose Diária Admissível

**DHA** - Ácido docosa-hexaenóico

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**DP** - Desvio-Padrão

**DPPH<sup>•</sup>** - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

**EC<sub>50</sub>** - Concentração de extracto correspondente a 50% da percentagem de inibição

**EFSA** - Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (European Food Safety Authority)

**EPA** - Ácido eicosapentaenóico

**FAO** - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations)

**FDA** - Administração da Alimentação e Drogas (Food and Drug Administration)

**FLD** - Detector de fluorescência

**FRAP** - Poder redutor férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power)

**g** - gramas

**H** - Percentagem de Humidade

**HAT** - Transferência de átomos de hidrogénio (Hydrogen Atom Transfer)

**HPLC** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performande Liquid Chromatography)

**ICH** - Conferência Internacional de Harmonização (International Conference on Harmonisation)

**LD** - Limite de Detecção

**LDL** - Lipoproteínas de baixa densidade

**LQ** - Limite de Quantificação

**mg** - miligrama

**min.** - minuto

**mL** - mililitro

**mM** - milimolar

**MS** - Espectrometria de massas

**n** - Número de réplicas

**ND** - Não determinado

**NP** - Norma Portuguesa

**°C** - graus Celsius

**ORAC** - Capacidade de absorção de radicais de oxigénio (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

**PI** - Percentagem de inibição

**PUFA** - Ácidos gordos polinsaturados

**r<sup>2</sup>** - Coeficiente de determinação

**Rec** - Recuperação

**ROO<sup>•</sup>** - Radical Peroxilo

**ROS** - Espécies reactivas de oxigénio

**Rpm** - Rotações por minuto

**RSD** - Desvio-padrão relativo

**RSN** - Espécies reactivas de azoto

**RT** - Tempo de retenção

**SET** - Transferência de um electrão (Single Electron Transfer)

**TEAC** - Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

**TRAP** - Capacidade sequestradora de radicais livres (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter)

**UE** - União Europeia

**UHPLC** - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

**USP** - Farmacopeia dos Estados Unidos (The United States Pharmacopeia)

**UV-Vis** - Ultravioleta-visível

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT .....	iv
ABREVIATURAS .....	vi
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xiv
Introdução Geral .....	xvi
I. Introdução.....	I
I.1 Origem e expansão do Lagostim vermelho americano ( <i>Procambarus clarkii</i> ).....	I
I.1.1 Espécie Invasora em Portugal.....	I
I.1.2 Hábitos alimentares .....	3
I.1.3 Morfologia externa .....	4
I.1.4 Composição química e nutricional.....	6
I.2 Os Carotenóides.....	9
I.2.1 Metabolismo de carotenóides em crustáceos .....	11
I.3 Astaxantina .....	12
I.3.1 Estrutura Química e Propriedades Físico-químicas.....	13
I.3.2 Estabilidade .....	15
I.3.3 Função Biológica: actividade antioxidante .....	17
I.3.4 Astaxantina sintética e natural .....	21
I.3.5 Principais fontes naturais.....	22
I.3.5.1 Microalgas.....	22

---

1.3.5.2 Leveduras.....	23
1.3.5.3 Subprodutos de crustáceos.....	24
1.3.6 Aplicações da astaxantina.....	29
1.3.6.1 Alimentação de Salmonídeos .....	29
1.3.6.2 Embalagens activas.....	30
1.3.6.3 Saúde e Cosmética .....	30
1.3.6.4 Alimentação de galinhas poedeiras.....	31
1.4 Métodos de avaliação da actividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	32
1.5 Processos de extracção de astaxantina a partir de subprodutos de crustáceos.....	34
1.5.1 Processos de pré-tratamento da amostra.....	36
1.5.1.1 Hidrólise enzimática.....	36
1.5.1.2 Tratamento térmico.....	36
1.5.1.3 Tamanho das partículas da amostra .....	37
1.5.1.4 Saponificação.....	37
1.5.1.5 Silagem química .....	38
1.5.1.6 Silagem bacteriana (Fermentação).....	39
1.5.2 Extracção com solventes orgânicos .....	40
1.5.3 Extracção com óleos de origem vegetal.....	41
1.5.4 Processo de extracção por ultra-sons.....	42
1.6 Métodos analíticos de quantificação da astaxantina .....	43
1.7 A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) nos crustáceos .....	46
2. Material e Métodos.....	50
2.1 Determinação da Humidade.....	50
2.2 Determinação da actividade antioxidante .....	51

---

2.2.1 Amostras biológicas em estudo.....	51
2.2.2 Reagentes e Padrões .....	51
2.2.3 Material Laboratorial.....	51
2.2.4 Determinação da actividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extractos de lagostim <i>P. clarkii</i> e camarão selvagem e de aquacultura ( <i>Penaeus sp.</i> ).....	52
2.2.4.1 Preparação dos extractos para determinação da actividade antioxidante .....	52
2.2.4.2 Actividade captadora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH') .....	53
2.2.4.3 Actividade captadora do catião radicalar ABTS <sup>•+</sup> .....	55
2.3 Determinação da astaxantina e do $\alpha$ -tocoferol no lagostim <i>Procambarus clarkii</i> .....	58
2.3.1 Amostras biológicas em estudo.....	58
2.3.2 Reagentes e Padrões .....	60
2.3.3 Material laboratorial .....	60
2.3.4 Preparação de soluções.....	60
2.3.4.1 Soluções padrão.....	60
2.3.4.2 Preparação da fase móvel .....	61
2.3.5 Preparação da amostra para determinação da astaxantina e do $\alpha$ -tocoferol em UHPLC- DAD.....	61
2.3.5.1 Processo de extracção .....	62
2.3.6 Análise cromatográfica.....	64
2.3.6.1 Sistema Cromatográfico.....	64
2.3.6.2 Condições Cromatográficas.....	66
2.4 Validação de metodologias analíticas .....	68
3. Resultados e Discussão.....	69
3.1 Determinação da Humidade.....	69
3.2 Avaliação da actividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extractos metanólicos de lagostim <i>P. clarkii</i> e do camarão selvagem e de aquacultura <i>Penaeus sp.</i> .....	70

---

3.3 Estudo dos parâmetros de validação.....	75
3.3.1 Estudo da selectividade.....	76
3.3.2 Linearidade .....	79
3.3.3 Limiares analíticos do método de ensaio .....	81
3.3.4 Precisão .....	83
3.3.5 Recuperação.....	86
3.4 Discussão dos resultados obtidos.....	88
4. Conclusões e Perspectivas Futuras .....	95
4.1 Conclusões.....	95
4.2 Perspectivas Futuras.....	97
5. Referências Bibliográficas.....	99
ANEXO I - Fórmulas Aplicadas.....	116

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Morfologia externa do lagostim <i>Procambarus clarkii</i> . Legenda: 1) anténula; 2) antena; 3) escama anterior; 4) acúmen do rostro; 5) espícula marginal; 6) rostro; 7) areola; 8) carapaça (exoesqueleto); 9) segmentos abdominais; 10) <i>ramus</i> interior do urópode; 11) <i>ramus</i> exterior do urópode; 12) pereiópodes; 13) télson; 14) olhos (Anastácio, 1993; Horn <i>et al.</i> , 2008).....	5
<b>Figura 2</b> Vias metabólicas de síntese de carotenóides em crustáceos (Tapia-Salazar <i>et al.</i> , 2008).....	12
<b>Figura 3</b> Estrutura molecular da astaxantina livre. Os átomos de carbono assimétricos estão representados nos números 3 e 3', respectivamente (EFSA, 2005).....	13
<b>Figura 4</b> Isómeros configuracionais da molécula de astaxantina (Higuera-Ciajara <i>et al.</i> , 2006).....	14
<b>Figura 5</b> Mecanismo de acção antioxidante da astaxantina em membranas biológicas (Pashkow <i>et al.</i> , 2008).....	20
<b>Figura 6</b> Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis (Guinaz <i>et al.</i> , 2009).....	47
<b>Figura 7</b> A) Camarão (Aquacultura); B) Lagostim; 1) Amostras após liofilização; 2) Amostras liofilizadas e trituradas; 3) Extractos metanólicos finais.....	53
<b>Figura 8</b> Estrutura da molécula de DPPH' na forma de radical livre (A) e na forma reduzida, não radicalar (B) (Molyneux, 2004).....	54
<b>Figura 9</b> Estrutura do catião radicalar, após reacção com o persulfato de potássio (Prioir <i>et al.</i> , 2005).....	56
<b>Figura 10</b> Amostras de lagostins <i>Procambarus clarkii</i> cruas usados para a quantificação da astaxantina e do $\alpha$ -tocoferol.....	58
<b>Figura 11</b> Componentes analisados do lagostim: A) Cefalotórax cru; B) Exoesqueleto cru; C) Parte edível crua; D) Cefalotórax cozido.....	62
<b>Figura 12</b> Tratamento e processo de extracção da amostra.....	64
<b>Figura 13</b> UPLC <sup>®</sup> , Acquity <sup>™</sup> da Waters.....	65
<b>Figura 14</b> A) Espectro de absorção máxima na região UV-vis da astaxantina (480 nm); B) Espectro de absorção máxima na região UV-vis do $\alpha$ -tocoferol (294 nm).....	66
<b>Figura 15</b> Curvas de calibração dos diferentes extractos metanólicos (n=3), da relação entre a concentração dos diferentes extractos e a percentagem de inibição do radical DPPH'.....	70

<b>Figura 16</b> Curva de calibração da relação entre a concentração da solução de Trolox (mM) e a percentagem de inibição do radical ABTS <sup>•+</sup> a 734 nm. Cinco níveis de concentração de Trolox em metanol entre 0,08-0,4 mM.....	72
<b>Figura 17</b> A) Pico cromatográfico do padrão de astaxantina (5 µg/ml) a 480 nm, tempo de retenção de 1,9 min.; B) Espectro de absorção UV-Vis do pico da astaxantina entre 210 e 500 nm. ....	77
<b>Figura 18</b> Pico cromatográfico da astaxantina (480 nm) no exoesqueleto cozido. Tempo de retenção de 1,8 min. ....	77
<b>Figura 19</b> A) Pico cromatográfico do padrão do α-tocoferol (2,5 µg/ml) a 294 nm, tempo de retenção de 13,2 min.; B) Espectro de absorção UV-Vis do pico do α-tocoferol entre 210 e 500 nm.....	78
<b>Figura 20</b> Pico cromatográfico do α-tocoferol avaliado a 294 nm no exoesqueleto cru. Tempo de retenção de 13,2 min.....	78
<b>Figura 21</b> Representação gráfica da curva de calibração do padrão da astaxantina, com dez níveis de concentração entre 0,05 e 20 µg/mL.....	80
<b>Figura 22</b> Representação gráfica da curva de calibração do padrão do α-tocoferol, com oito níveis de concentração entre 0,6 e 30 µg/mL. ....	80
<b>Figura 23</b> Picos cromatográficos da astaxantina (ATX) a 480 nm, no exoesqueleto cozido (A) e no exoesqueleto cru (B).....	92

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Composição em aminoácidos essenciais do lagostim <i>P. clarkii</i> (músculo e exoesqueleto) do Rio Nilo (Cairo) (Hamdi, 2011) e do lagostim <i>P. clarkii</i> (inteiro) de Sevilha, Espanha (Cremades et al., 2001). .....	7
<b>Tabela 2</b> Composição em ácidos gordos insaturados do músculo e exoesqueleto do lagostim <i>P. clarkii</i> , capturado no Rio Nilo, Cairo (Hamdi, 2011). .....	8
<b>Tabela 3</b> Espécies reactivas de oxigénio (ROS). .....	17
<b>Tabela 4</b> Quantidade de astaxantina presente em vários subprodutos de crustáceos (Adaptado de Higuera-Ciapara et al., 2006). .....	26
<b>Tabela 5</b> Massa (g) das amostras de lagostim <i>Procambarus clarkii</i> usadas na análise em UHPLC-DAD. ....	59
<b>Tabela 6</b> Percentagem (%) do peso de cada componente do lagostim em relação ao peso total. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão (%). .....	59
<b>Tabela 7</b> Condições experimentais do sistema UHPLC-DAD para determinação da astaxantina e do $\alpha$ -tocoferol em amostras de lagostim <i>P. clarkii</i> . .....	67
<b>Tabela 8</b> Gradiente de eluição para a fase móvel (A): [diclorometano / metanol (com 0,05 M de acetato de amónio) / acetonitrilo 5:20:75 (v/v/v)] e (B): água ultrapura. ....	67
<b>Tabela 9</b> Percentagem de humidade presente em crustáceos inteiros, de origem selvagem e crus. ....	69
<b>Tabela 10</b> Dados obtidos da percentagem de humidade presente nos três componentes do lagostim <i>P. clarkii</i> selvagem e cru. ....	69
<b>Tabela 11</b> Actividade antioxidante dos diferentes extractos metanólicos de concentração de 7,1 mg/ml (n=3) expressa em TEAC (mM Trolox/g de extracto), e as respectivas percentagens de inibição. ....	72
<b>Tabela 12</b> Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) em crustáceos para a determinação da astaxantina, obtidos pelo método da relação sinal-ruído (S/R), na razão de 3:1 (LD) e 10:1 (LQ). ....	82
<b>Tabela 13</b> Limites de detecção (LD) em diferentes matrizes para a determinação do $\alpha$ -tocoferol, obtidos pelo método da relação sinal ruído (S/R), na razão de 3:1. ....	82
<b>Tabela 14</b> Quantidade média de astaxantina ( $\mu$ g/g) e a precisão intra-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim <i>P. clarkii</i> cru e cozido (n=3). ....	83
<b>Tabela 15</b> Quantidade média de astaxantina ( $\mu$ g/g) e a precisão inter-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim <i>P. clarkii</i> cru e cozido (n=9). ....	84

---

<b>Tabela 16</b> Quantidade média de $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ ) e a precisão intra-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim <i>P. clarkii</i> cru e cozido (n=3). .....	84
<b>Tabela 17</b> Quantidade média de $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ ) e a precisão inter-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim <i>P. clarkii</i> cru e cozido (n=9). .....	85
<b>Tabela 18</b> Valores de recuperação (%) obtidos no exosqueleto, cefalotórax e lagostim inteiro, para cada nível de fortificação de astaxantina. ....	87
<b>Tabela 19</b> Valores da quantidade de astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ) obtida nos diferentes componentes do lagostim <i>P. clarkii</i> e os dados reportados do estudo de Sanches-Silva <i>et al.</i> (2012b) para o camarão. ....	89

## Introdução Geral

O lagostim *Procambarus clarkii* é um crustáceo invasor, que actualmente representa uma praga ambiental no território nacional (Anastácio *et al.*, 2000). Esta espécie também está incluída na lista das espécies que mais ameaçam a biodiversidade aquática na Europa (Mendes, 2011).

A obtenção de astaxantina através de subprodutos de crustáceos tem sido amplamente estudada pelo facto deste composto bioactivo ser um dos antioxidantes naturais mais poderosos e economicamente valiosos devido às suas funções biológicas (Sachindra *et al.* 2005a; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008; Sanches-Silva *et al.*, 2012b).

No caso específico do lagostim invasor *P. clarkii*, o teor de astaxantina também tem sido investigada (Meyers & Chen, 1983; Meyers *et al.*, 1990).

Em Portugal, esta espécie apenas tem sido estudada na área da ecologia, devido ao seu impacto na biodiversidade e aos danos causados na orizicultura (Anastácio, 1993; Anastácio *et al.*, 2000). Contudo, o presente estudo teve uma perspectiva diferente, nomeadamente, na caracterização e valorização desta espécie exótica através do estudo de compostos bioactivos de elevado valor comercial e com inúmeras aplicações biomédicas, na tecnologia alimentar e na alimentação animal.

Particularmente, com esta dissertação pretendeu-se determinar o teor de astaxantina e de  $\alpha$ -tocoferol no lagostim *Procambarus clarkii* e seus subprodutos por UHPLC-DAD. Comparar o teor de astaxantina e de  $\alpha$ -tocoferol nos diferentes componentes do lagostim (cefalotórax, porção edível e exoesqueleto), assim como, a influência da cozedura no teor dos mesmos. Outro dos objectivos consistiu na avaliação das propriedades antioxidantes do lagostim *P. clarkii* e do camarão selvagem e de aquacultura (*Penaeus sp.*) através dos ensaios dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, estabelecendo-se uma comparação entre as amostras.

O presente trabalho encontra-se organizado em cinco partes fundamentais, designadas por introdução (1), material e métodos (2), resultados e discussão (3), conclusões e perspectivas futuras (4) e referências bibliográficas (5).

Na revisão bibliográfica aborda-se inicialmente a matriz em estudo, lagostim *Procambarus clarkii*, numa perspectiva de explicar a sua origem geográfica, o seu carácter invasivo e os seus hábitos alimentares. Posteriormente é realizada a caracterização desta espécie sob o ponto de vista da sua morfologia externa e da composição química e nutricional. A astaxantina é explorada quanto às propriedades físico-químicas, estabilidade e

à actividade antioxidante. São caracterizadas as principais fontes e aplicações da astaxantina. São abordados os métodos existentes para a avaliação da actividade antioxidante. É feita também uma revisão crítica dos processos de extracção da astaxantina, a partir de subprodutos de crustáceos, e dos métodos analíticos para a sua quantificação. No final o  $\alpha$ -tocoferol também é explorado quanto às suas características químicas e biológicas, assim como, são dadas a conhecer as metodologias analíticas que permitem a quantificação do mesmo.

No capítulo do material e métodos caracterizam-se as amostras biológicas, reagentes, materiais e os métodos aplicados na determinação da actividade antioxidante. Na determinação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol também são caracterizadas as amostras biológicas, reagentes, material, o método de extracção e as condições cromatográficas aplicadas.

Nos resultados e discussão, inicialmente são comparados os resultados da actividade antioxidante obtidos pelos métodos dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> no lagostim *P.clarkii* e no camarão selvagem e de aquacultura. Seguidamente, são discutidos os parâmetros de validação determinados e é feita uma comparação entre os resultados obtidos no teor de astaxantina e de  $\alpha$ -tocoferol e os dados reportados da literatura.

Por fim, são apresentadas conclusões gerais do trabalho efectuado, assim como sugestões de trabalhos futuros.

## I. Introdução

### I.1 Origem e expansão do Lagostim vermelho americano (*Procambarus clarkii*)

O lagostim americano da Louisiana, designado cientificamente como *Procambarus clarkii*, é um crustáceo da ordem Decapoda e da família *Cambaridae* (Mendes, 2011). Este crustáceo é originário do nordeste do México e região centro-sul dos Estados Unidos (Gherardi *et al.*, 2000).

Esta espécie tem uma grande capacidade de adaptação, logo foi facilmente expandida em diversas áreas geográficas. Como resultado de introduções por acção humana, pode encontrar-se nas seguintes áreas geográficas: África, América do Sul e Central, Ásia Continental, Pacífico, Caraíbas e Europa. Na Austrália e na Antárctida não existe esta espécie de lagostim (Anastácio, 1993). No início dos anos 70, ocorreu a introdução deste lagostim em Espanha com objectivos comerciais, nomeadamente para alimentação humana, tendo-se expandido rapidamente por toda a Península Ibérica (Gherardi *et al.*, 2000; Mendes, 2011).

Em 1979, o lagostim *P. clarkii* foi avistado pela primeira vez em Portugal no Rio Caio, um afluente do Rio Guadiana. Tendo em conta a adaptabilidade e tolerância desta espécie a uma vasta gama de condições ambientais ocorreu uma grande expansão, em habitats de água doce do território nacional, desde essa data (Anastácio, 1993; Mendes, 2011).

Em 1986 ocupava já uma vasta área do Sul de Portugal e em 1987 foi assinalado pela primeira vez no Baixo Mondego, tendo em 1990 ocorrido as primeiras notícias de danos graves na orizicultura desta zona (Anastácio, 1993; Anastácio *et al.*, 2000).

#### I.1.1 Espécie Invasora em Portugal

Actualmente o lagostim *Procambarus clarkii* está incluído na lista das espécies que mais ameaçam a biodiversidade aquática na Europa e entre as 20 mais prejudiciais em Espanha (Mendes, 2011). Segundo a legislação portuguesa, Decreto-Lei nº 565/99, este lagostim é evidenciado como uma espécie invasora em quase todas as bacias hidrográficas e nas ribeiras do Oeste e do Algarve, com excepção das bacias do Minho, Lima e Cávado e Ave. Porém, esta espécie já tem sido encontrada nos rios da região do Norte, como os casos do Rio Vouga, Douro e Ave (Moreira, 2011).

O lagostim vermelho *Procambarus clarkii* é encontrado numa variada gama de habitats, tais como, em sapais, rios, cursos de água com pouca corrente, albufeiras, prados húmidos, canais de irrigação e nos arrozais (Anastácio *et al.*, 2000; Leitão, 2009; Nunes, 2011).

De acordo com o Decreto-Lei nº 565/99, uma espécie invasora consiste “numa espécie susceptível de, por si própria, ocupar o território de uma forma excessiva, em área ou em número de indivíduos, provocando uma modificação significativa nos ecossistemas”. A introdução de espécies não indígenas na Natureza, como o caso do lagostim *Procambarus clarkii*, pode causar situações de predação ou competição com espécies nativas, a transmissão de agentes patogénicos ou de parasitas e afectar seriamente a diversidade biológica, as actividades económicas, com prejuízos irreversíveis e de difícil contabilização. Acresce ainda que, quando é necessário o controlo ou a erradicação de uma espécie introduzida, que se tornou invasora, os processos são especialmente complexos e onerosos (Anastácio, 1993).

Esta espécie possui várias características que fazem dela uma espécie com grande carácter invasivo em Portugal. *Procambarus clarkii* apresenta uma taxa de crescimento elevada, alta fecundidade, alto potencial reprodutivo, maturidade precoce e pode ter várias gerações num único ano (Anastácio, 1993; Henriques, 2010). Tem a capacidade de se adaptar a diversas condições ambientais e a diferentes recursos alimentares. É considerado um crustáceo com elevada plasticidade ecológica, sendo o maior na ordem Decapoda (Leitão, 2009). Relativamente às condições ambientais, são capazes de tolerar alguma salinidade, secas sazonais, altas temperaturas e baixos níveis de oxigénio e a poluição (Ilhéu *et al.*, 2003; Leitão, 2009; Nunes, 2011).

No seu habitat natural, este lagostim é omnívoro, ou seja, alimenta-se de matéria vegetal e animal viva ou morta, e tem uma dieta oportunista adequando a sua alimentação consoante o habitat onde se insere e pode adoptar, em determinadas circunstâncias, o canibalismo (Anastácio, 2003; Correia, 2003). Sabe-se que este lagostim consome detritos, vegetação e animais. Entre os animais que podem ser capturados incluem-se moluscos, insectos, vermes, ovos e larvas de anfíbios, e mesmo alguns peixes. Dentro da matéria vegetal incluem-se algas, macrófitas aquáticas e sementes. Todas estas características permitem que o lagostim *P. clarkii* possa construir rapidamente grandes populações e promover o seu elevado potencial invasivo (Anastácio, 1993; Ilhéu *et al.*, 2003; Nunes, 2011).

Todo o processo de estabelecimento e proliferação do lagostim vermelho tem provocado alterações significativas nas características e funcionamento de grande parte dos ecossistemas aquáticos da Península Ibérica, resultando em prejuízos ecológicos e socioeconómicos (Geiger *et al.*, 2005; Mendes, 2011). O caso da introdução deste lagostim na Bacia do Mondego ilustra bem este fenómeno. Esta espécie invadiu e colocou em causa não só a sobrevivência do lagostim nativo (*Austropotamobius pallipes*) como a própria produtividade dos arrozais onde proliferou (Anastácio, 1997; Pinto *et al.*, 2009)

A orizicultura em Portugal tem sofrido uma série de danos desde o aparecimento desta espécie. A causa dos danos tem sido explicada pelo comportamento escavatório do lagostim, ou seja, ao efectuar buracos nos arrozais permite fugas de água, destrói plantas e aumenta a turbidez e a opacidade da água. A opacidade da água poderá dificultar a sobrevivência dos jovens rebentos de arroz, pois dependem da luz para um correcto crescimento em direcção à superfície. De forma a evitar danos na produção de arroz, os agricultores tentaram erradicar populações de lagostins por meio de produtos químicos. Porém, estes métodos mostraram-se ineficazes e tiveram um impacto devastador sobre espécies úteis (Anastácio, 1993; Anastácio, 1997; Anastácio *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Hábitos alimentares

Como foi referido anteriormente, o lagostim *Procambarus clarkii* é omnívoro e possui uma dieta oportunista (Anastácio, 1993; Ilhéu *et al.*, 2003). Segundo alguns autores existem vários factores que influenciam a escolha alimentar deste crustáceo (Correia, 2002; Ilhéu *et al.*, 2003).

De acordo com um estudo realizado em Portugal, onde foi quantificado o conteúdo de alimentos no estômago de lagostins *P. clarkii* capturados em campos de arroz do Tejo, existe uma relação entre as estações do ano e os estádios de crescimento do lagostim (juvenil, pré-adulto, adulto) com a escolha do alimento (Correia, 2002; Correia, 2003).

A quantidade de matéria animal ingerida é significativamente diferente entre os vários estádios de crescimento (relação ontogénica). Os lagostins juvenis apresentaram maior consumo de matéria animal (44%), seguido de detritos (29%) e matéria vegetal (27%). Os pré-adultos e adultos apresentaram um consumo significativamente maior em detritos (39% e 41%, respectivamente) e plantas (34% e 39% respectivamente) do que em matéria animal (27% e 20%, respectivamente). Estes resultados indicam que existe uma diminuição na

utilização de presas animais e um aumento de detritos e plantas com a evolução do estágio de crescimento dos indivíduos *P. clarkii* (Correia, 2002; Correia, 2003).

Estes dados confirmam outros estudos realizados, que evidenciam um aumento no consumo de matéria vegetal ao longo da vida, sendo que 75% são macrófitas aquáticas (Ilhéu *et al.*, 1991; Geiger *et al.*, 2005; Carreira, 2010).

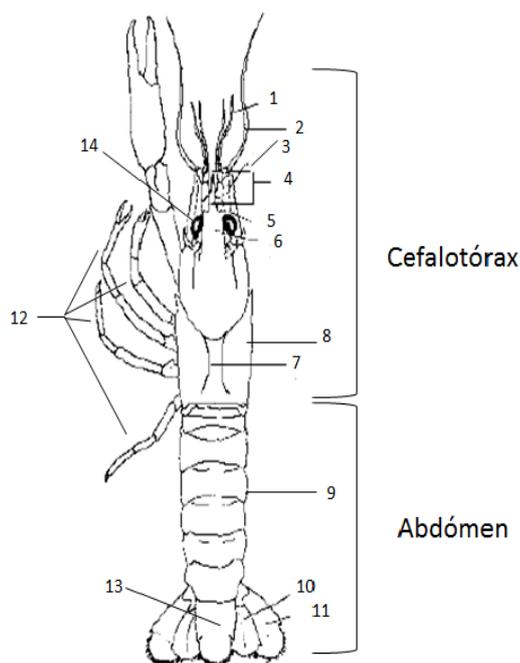
Segundo Correia (2002) os dados mostraram uma certa relação da sazonalidade com a escolha alimentar. Na Primavera e Verão existe um aumento do consumo de plantas, em toda a população de lagostins (diferentes estádios), registando-se um decréscimo entre o Outono e o Inverno. Sendo que, a matéria animal é mais consumida no Inverno e decresce entre a Primavera e o Verão. Relativamente a comportamentos de canibalismo e necrofagia, apenas os lagostins pré-adultos e adultos apresentam essa tendência, como forma de colmatar a necessidade de proteína animal em habitats pobres em invertebrados.

Contudo, é importante referir que a escolha alimentar do *P. clarki* está também dependente da disponibilidade em alimento no meio onde se insere (Ilhéu *et al.*, 2003). Segundo um estudo realizado em Espanha, o lagostim *P. clarkii* consumia principalmente matéria vegetal em pântanos do Parque Nacional Doñana, sendo que a razão atribuída a este comportamento alimentar foi a disponibilidade dos recursos (Gutiérrez-Yurrita *et al.*, 1998).

O consumo de detritos de matéria vegetal prende-se com a sua riqueza energética, dado que, depois de mortas, as plantas ficam cobertas por uma camada de fungos e bactérias muito rica em proteínas (Geiger *et al.*, 2005; Carreira, 2010). É de salientar que, a matéria vegetal viva de coloração verde, é uma importante fonte de carotenóides na dieta do lagostim vermelho *P. clarkii* (Geiger *et al.*, 2005).

### **1.1.3 Morfologia externa**

O corpo do lagostim *P. clarkii* é dividido em duas partes, nomeadamente, o cefalotórax (cabeça e tórax) e o abdómen (Horn *et al.*, 2008). O cefalotórax termina num prolongamento designado de rostro e é constituído por duas pinças, um conjunto de oito patas de locomoção, um par de antenas e um par de antênulas. O abdómen é constituído por cinco pares de patas (pleópodes) não locomotores, terminando o abdómen no télson e urópodes, uma região achatada que é utilizada para locomoção, mais propriamente, para propulsionar o corpo para trás (Anastácio, 1993). Na Figura 1 é descrita a morfologia externa do lagostim *P. clarkii*.



**Figura 1** Morfologia externa do lagostim *Procambarus clarkii*. Legenda: 1) anténula; 2) antena; 3) escama anterior; 4) acúmen do rostró; 5) espícula marginal; 6) rostró; 7) areola; 8) carapaça (exoesqueleto); 9) segmentos abdominais; 10) *ramus* interior do urópode; 11) *ramus* exterior do urópode; 12) pereiópodes; 13) télson; 14) olhos (Anastácio, 1993; Horn *et al.*, 2008)

Um processo de crucial importância no desenvolvimento e maturação dos crustáceos é a muda do exoesqueleto (carapaça). A muda é caracterizada pelo crescimento de um exoesqueleto novo por debaixo do antigo (Anastácio, 1993; Martins *et al.*, 2009). O crescimento do lagostim *P. clarkii* dá-se através de mudas periódicas, sendo que, a nova cobertura do corpo, enquanto não endurece totalmente, permite ao animal aumentar de tamanho. A muda pode ser prevista de acordo com o escurecimento da carapaça e pela suspensão do comportamento alimentar. Este processo é tanto mais frequente quanto mais jovens forem os indivíduos. É de referir, ainda, que a frequência das mudas pode ser afectada por danos de natureza física (ex. perda de membros), química (ex. intoxicação por pesticidas) ou mesmo pela fase do ciclo reprodutivo em que o animal se encontra (Anastácio, 1993)

O exoesqueleto dos crustáceos é formado por quitina, proteínas, carotenóides (principalmente astaxantina) e sais minerais (carbonato de cálcio e de fosfatos,

principalmente) (Mohamed *et al.*, 2000; Cremades *et al.*, 2001; Zavaleta, 2010). Sendo que, o carbonato de cálcio é um composto inorgânico responsável pelo endurecimento do exoesqueleto após a muda (Anastácio, 1993).

#### 1.1.4 Composição química e nutricional

De acordo com a literatura o lagostim *Procambarus clarkii* é um crustáceo altamente nutritivo, rico em proteínas e de baixo valor calórico (Mohamed *et al.*, 2000; Cremades *et al.*, 2001; Cremades *et al.*, 2003; Hamdi, 2011).

Num estudo foi determinada a composição química média do lagostim selvagem inteiro, apresentando 76% de humidade, 2% de gordura, 1,45% de cinzas, 0,07% de hidratos de carbono, 20% de proteínas, 0,12% de fibra e um valor energético de 98 Kcal por porção de 100g (El-Kholie *et al.*, 2012). Outros estudos obtiveram resultados com valores aproximados (Elmossalami & Eman, 1999; Mohamed *et al.*, 2000; Cremades *et al.*, 2001; Pérez-Gálvez *et al.*, 2008). Contudo, é importante salientar que a composição química pode variar de acordo com a alimentação, habitat, espécie, idade e a estação do ano (Zavaleta, 2010)

Na generalidade, esta espécie possui um elevado teor de aminoácidos essenciais, ácidos gordos essenciais ómega-3 e ómega-6 e carotenóides (principalmente astaxantina), constituindo uma excelente fonte nutricional para pacientes com desnutrição (Cremades *et al.*, 2003; Hamdi, 2011).

As proteínas são de alta qualidade, contendo as concentrações adequadas dos aminoácidos essenciais, ou seja, vão de encontro com os requisitos nutricionais definidos pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) (Cremades *et al.*, 2001). Dentro dos aminoácidos essenciais identificados, no exoesqueleto e músculo do lagostim, destacam-se a arginina, lisina, treonina, metionina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, histidina e a isoleucina (Cremades *et al.*, 2001; Hamdi, 2011). Tendo em conta o acrescido valor nutricional do lagostim *P. clarkii*, pode-se dizer que o seu aproveitamento poderá ser atractivo para o desenvolvimento de nutracêuticos e alimentos funcionais. É possível desenvolver produtos (nutracêuticos, alimentos funcionais) de alta qualidade que requerem alto teor de aminoácidos essenciais (Cremades *et al.*, 2001; Cremades *et al.*, 2003). Na Tabela I encontram-se os valores de aminoácidos essenciais em lagostins *P. clarkii* capturados em zonas geográficas diferentes.

**Tabela I** Composição em aminoácidos essenciais do lagostim *P. clarkii* (músculo e exoesqueleto) do Rio Nilo (Cairo) (Hamdi, 2011) e do lagostim *P. clarkii* (inteiro) de Sevilha, Espanha (Cremades et al., 2001).

Aminoácidos essenciais	<i>P. clarkii</i> Selvagem do Rio Nilo (Cairo)		Lagostim selvagem de Sevilha, Espanha
	Músculo (mg/100g de amostra)	Exoesqueleto (mg/100g de amostra)	<i>P. clarkii</i> inteiro (mg/g de proteína)
Arginina	288,29	257,73	62,2
Lisina	178,51	105,21	73,0
Treonina	416,64	372,48	65,6
Metionina	167,43	132,16	31,4
Leucina	189,68	169,57	72,7
Isoleucina	329,81	351,17	-
Valina	229,87	205,50	51,2
Fenilalanina	244,7	218	49,1
Histidina	146,04	130,56	29,0
Proteína total (g/100g)	43,24	39,8	-

Na fracção lipídica foram identificados ácidos gordos insaturados, nomeadamente, ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido miristoleico, ácido araquidónico, ácido docosahexaenóico (DHA), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido linoleico (ómega 6) e o ácido  $\alpha$ -linolénico (ómega 3) (Hamdi, 2011). Sendo que, no caso dos ácidos gordos essenciais, a concentração em ácido linoleico (ómega-6) é bastante superior ao  $\alpha$ -linolénico (ómega-3) (Hamdi, 2011). A Tabela 2 apresenta a composição em ácidos gordos insaturados no lagostim *P. clarkii* no estado selvagem.

Na fracção lipídica destes crustáceos também se encontram dissolvidos compostos responsáveis pelo aroma, sabor e a cor característica do lagostim *P. clarkii*. A cor vermelha característica do lagostim resulta dos carotenóides lipossolúveis, principalmente da astaxantina (diéster, monoéster e livre) (Cremades et al., 2001; Pérez-Gálvez et al., 2008; Zavaleta, 2010). A astaxantina é um dos antioxidantes naturais mais poderosos, sendo economicamente valioso devido às suas funções biológicas (Cremades et al., 2001).

**Tabela 2** Composição em ácidos gordos insaturados do músculo e exoesqueleto do lagostim *P. clarkii*, capturado no Rio Nilo, Cairo (Hamdi, 2011).

<b>Ácidos gordos insaturados</b>	<b>Músculo (mg/100g de amostra)</b>	<b>Exoesqueleto (mg/100g de amostra)</b>
<b>Ácido oleico</b>	5,12	5,03
<b>Ácido palmitoleico</b>	8,59	8,47
<b>Ácido miristoleico</b>	1,28	1,66
<b>Ácido araquidónico</b>	48,58	53,89
<b>Ácido docosa-hexaenóico (DHA)</b>	1,36	1,75
<b>Ácido eicosapentaenóico (EPA)</b>	0,77	0,76
<b>Ácido linoleico (ómega-6)</b>	67,74	66,74
<b>Ácido <math>\alpha</math>-linolénico (ómega-3)</b>	0,51	0,66

O lagostim *P. clarkii* constitui também uma fonte rica em diversos minerais. Os que existem em maior quantidade são o fósforo (P), cálcio (Ca), potássio (K), sódio (Na) e o magnésio (Mg) (Cremades *et al.*, 2001; Hamdi, 2011).

Tanto o exoesqueleto como o músculo do lagostim constituem também uma fonte de vitaminas e possuem valores muito próximos, por ordem decrescente da concentração, destaca-se a vitamina E, vitamina D, vitamina B<sub>3</sub>, vitamina A, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>6</sub> e vitamina B<sub>12</sub> (Hamdi, 2011).

Outro componente químico importante é a quitina constituindo 55% dos subprodutos do lagostim *P. clarkii*, sendo considerado um dos biomateriais mais promissores para o futuro (Cremades *et al.*, 2001). Este polissacarídeo é encontrado principalmente no exoesqueleto dos crustáceos mas também em insectos e nas paredes celulares dos fungos, sendo um homopolímero linear composto por ligações poli-N-acetil-D-glucosamina (Martins *et al.*, 2009). Este composto, nos crustáceos, encontra-se esterificado com proteínas formando uma rede muito estável. Os sais minerais encontram-se unidos a esta rede conferindo dureza à carapaça (exoesqueleto), protegendo o corpo e os órgãos vitais durante a vida adulta dos crustáceos (Zavaleta, 2010).

O quitosano (CAS 9012-76-4), um copolímero linear com unidades de  $\beta(1.4)$  2-acetamido-2-desoxi-D-glucose e 2-amino-2-desoxi-D-glucose em diferentes proporções, é obtido pela desacetilação parcial da quitina. O grau de desacetilação (DA) está directamente relacionado com a solubilidade, conformação do polímero e a actividade antimicrobiana (Lago *et al.*, 2011; Sanches-Silva *et al.*, 2012a). A purificação da quitina é feita através da desmineralização com ácido clorídrico (HCl), desproteinização por hidrólise alcalina ou

enzimas proteolíticas e a despigmentação através de uma mistura de éter-de-petróleo: acetona: água. O quitosano tem múltiplas aplicações na área farmacêutica, biomédica e tecnologia alimentar devido às suas características apelativas. As principais aplicações são como adsorventes de corantes, sistemas de libertação controlada de fármacos (“drug delivery systems”) e como agente antimicrobiano. Devido à sua actividade antimicrobiana tem sido estudada a aplicação do quitosano em embalagens activas de forma a inibir o crescimento microbiológico em alimentos (Sanches-Silva *et al.*, 2012a).

## 1.2 Os Carotenóides

Os carotenóides constituem um grupo numeroso de pigmentos difundidos na natureza, com mais de 600 estruturas caracterizadas, identificados em organismos fotossintéticos e não fotossintéticos. São responsáveis pelas cores do amarelo ao vermelho de frutas, vegetais, flores, insectos, plantas superiores, algas (*Haematococcus sp.*), leveduras (*Phaffia rhodozyma*), bactérias (*Corynebacterium poinsetiae*), músculo de alguns peixes (salmão e truta), crustáceos (camarão, lagostim, lagosta) e plumagem de alguns flamingos e canários (Uenojo *et al.*, 2007). É de notar que, no caso dos animais, a presença de carotenóides é devido à dieta, pois apenas as plantas superiores, algumas bactérias e leveduras conseguem sintetizar carotenóides (Delgado-Vargas *et al.*, 2003; EFSA, 2005).

Relativamente à estrutura e propriedades físico-químicas, os carotenóides são tetraterpenos de 40 átomos de carbono. Constituem uma estrutura linear e simétrica formada por oito unidades de isoprenoides de 5 carbonos, unidos por ligações covalentes, de tal maneira que a disposição se inverte no centro da molécula (Rodríguez-Amaya, 1999). Esta estrutura básica acíclica pode modificar-se de diversas maneiras, como por exemplo, por hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de cadeias duplas, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigénio ou a combinação destes processos, resultando numa grande diversidade de estruturas de carotenóides (Uenojo *et al.*, 2007).

Uma característica estrutural distinta nos carotenóides é a extensa cadeia hidrocarbonada com ligações duplas, que consiste na alternância de ligações simples (C-C) e ligações duplas (C=C). Na generalidade, designa-se por cadeia poliénica (Rodríguez-Amaya, 1999).

A característica de absorção de luz na região do UV/visível dos carotenóides deve-se à cadeia de duplas ligações conjugadas que actua como cromóforo, o que explica a cor destes compostos. O espectro de absorção máximo tem comprimentos de onda que dependem do número de ligações duplas. Sendo que, são necessárias, pelo menos, sete ligações duplas conjugadas para que estes compostos produzam cor. A intensidade e a tonalidade das cores nos alimentos dependem do tipo de carotenóides presentes, concentrações e estado físico. Os carotenóides, em geral, são compostos lipofílicos e são praticamente insolúveis em água (Rodríguez-Amaya, 1999).

Os carotenóides dividem-se em dois grupos: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos polinsaturados, não contêm oxigénio, e normalmente produzem uma cor laranja. Nesta classe inclui-se o licopeno e o  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -caroteno (Shahidi & Brown, 1998; Rodríguez-Amaya, 1999).

As xantofilas resultam da oxidação de carotenos e contêm um ou mais grupos oxigenados em locais particulares dos anéis terminais. As funções oxigenadas mais comuns são o grupo hidroxilo (OH) na luteína, zeaxantina e a criptoxantina, e o grupo cetónico (C=O) na cantaxantina, ou ambos como é o caso da astaxantina. Também se podem encontrar os grupos aldeído (CHO), metoxilo (OMe), epóxi (epóxidos 5,6 ou 5,8) como no caso da violaxantina e o carboxilo (CO<sub>2</sub>H) (Shahidi & Brown, 1998; Rodríguez-Amaya, 1999).

É de notar que, os carotenos e as xantofilas podem ser acíclicos (exemplo: licopeno), monocíclicos e bicíclicos. A ciclização ocorre numa ou em ambas as extremidades da molécula. Assim, o  $\gamma$ -caroteno (1 anel  $\beta$ ) é monocíclico  $\beta$ , enquanto que o  $\beta$ -caroteno (2 anéis  $\beta$ ) e o  $\alpha$ -caroteno são bicíclicos (anéis  $\gamma$  e  $\beta$ ). As xantofilas bicíclicas são a astaxantina, zeaxantina e a  $\beta$ -criptoxantina possuem dois anéis  $\beta$ . No caso da luteína e da  $\alpha$ -criptoxantina possuem os anéis  $\beta$  e  $\gamma$  (Rodríguez-Amaya, 1999; Zavaleta, 2010).

A cadeia poliénica é também responsável pela instabilidade dos carotenóides incluindo a sua susceptibilidade à oxidação e isomerização geométrica (alteração da geometria da ligação dupla). O calor, a luz e os ácidos promovem a isomerização dos carotenóides da sua forma *trans*, configuração habitual em natureza, para a configuração *cis* (Zavaleta, 2010).

As principais funções dos carotenóides na saúde são: actividade provitamina A (precursor da vitamina A), aumento da imunidade, actividade antioxidante, prevenção da

doença cardiovascular, diminuição do risco de formação de cataratas e prevenção do cancro (Rodríguez-Amaya, 1999).

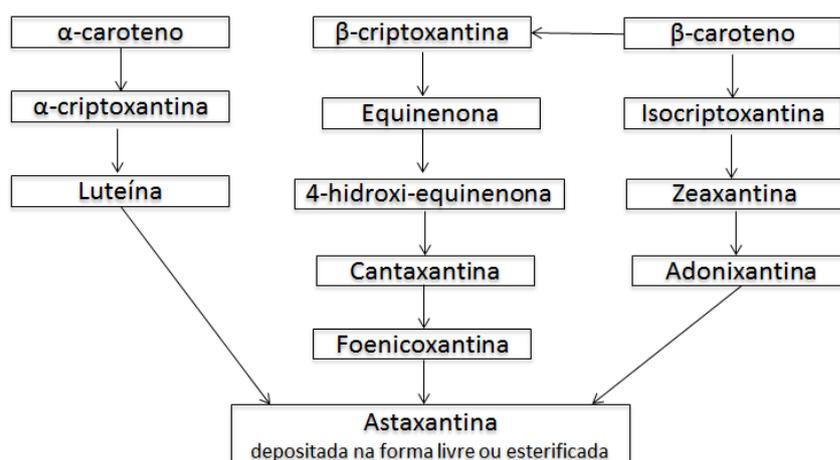
A actividade provitamina A é uma das mais importantes funções biológicas dos carotenóides em animais (Shahidi & Brown, 1998; Rodríguez-Amaya, 1999). Quase todos os animais são capazes de converter enzimaticamente carotenóides vegetais em vitamina A, sendo esta essencial para a visão, crescimento e reprodução. Apenas 50 dos 700 carotenóides naturais conhecidos são convertidos em vitamina A, sendo que, o  $\beta$ -caroteno é o principal carotenóide precursor da vitamina A. Outros carotenóides com actividade provitamina A incluem o  $\alpha$ -caroteno, criptoxantina, citranaxantina e a 3,4-dehidro- $\beta$ -caroteno (Shahidi & Brown, 1998). O que determina a actividade provitamina A na estrutura do carotenóide é a presença do anel  $\beta$ -ionona (Sanches-Silva *et al.*, 2013).

As xantofilas não são percussores da vitamina A em mamíferos, e no caso da cantaxantina e da astaxantina apenas são percussores da vitamina A em determinados peixes e pássaros (Shahidi & Brown, 1998; EFSA, 2005).

### **1.2.1 Metabolismo de carotenóides em crustáceos**

Em contraste com as plantas (sintetizadoras de carotenóides), a distribuição quantitativa e qualitativa dos carotenóides em espécies de crustáceos deve-se aos hábitos alimentares específicos de cada espécie, características de absorção e às actividades metabólicas. Os carotenóides podem ser convertidos na forma esterificada, livre ou unidos a proteínas (Meyers, 2000.) A astaxantina é o carotenóide predominante em crustáceos da ordem Decapoda. Estes depositam directamente a astaxantina da dieta no exoesqueleto e convertem o  $\beta$ -caroteno, zeaxantina e a luteína em astaxantina esterificada ou livre. A Figura 2 mostra as vias metabólicas de síntese da astaxantina em crustáceos (Meyers, 2000; Tapia-Salazar *et al.*, 2008).

Outros carotenóides presentes no lagostim *P. clarkii* são o  $\beta$ -caroteno, equinenona e a foenicoxantina. No camarão encontra-se presente, além da astaxantina, o  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, luteína, equinenona, zeaxantina e a criptoxantina (Shahidi & Brown, 1998).



**Figura 2** Vias metabólicas de síntese de carotenóides em crustáceos (Tapia-Salazar *et al.*, 2008).

### 1.3 Astaxantina

A astaxantina é o principal carotenóide encontrados em crustáceos (exemplo: camarão, lagostim, lagosta, caranguejo) e salmonídeos (salmão, truta), sendo responsável pela coloração rosa-vermelho do salmão e crustáceos (Ogawa *et al.*, 2000; EFSA, 2005; Seabra & Pedrosa, 2010; Zavaleta, 2010)

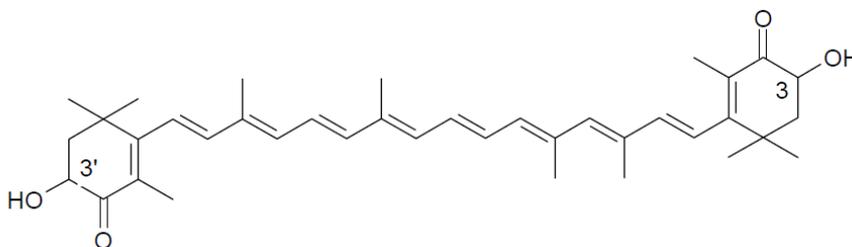
Este carotenóide é sintetizado por algas (*Haematococcus pluvialis*), leveduras (*Phaffia rhododyma*) e algumas bactérias, mas também, pode ser isolado de subprodutos de crustáceos e salmonídeos (EFSA, 2000; Seabra & Pedrosa, 2010). Este composto tem despertado grande interesse na medicina devido às suas funções biológicas, como a elevada actividade antioxidante (Seabra & Pedrosa, 2010).

Vários trabalhos de investigação focam-se na identificação, produção e utilização de fontes naturais de astaxantina como uma via alternativa aos pigmentos sintéticos que actualmente cobrem a maioria dos mercados mundiais (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). A astaxantina é amplamente utilizada em aquacultura de salmonídeos e crustáceos, a fim de conferir uma coloração desejável e de forma a responder à satisfação dos consumidores e aumentar o valor comercial do produto. Além de promover a pigmentação, tem funções importantes na reprodução, metabolismo e saúde dos salmonídeos (Ogawa *et al.*, 2000; EFSA, 2005).

### 1.3.1 Estrutura Química e Propriedades Físico-químicas

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta,\beta$ -caroteno-4,4-diona) é um carotenóide que contém 40 átomos de carbono. Tem como fórmula molecular  $C_{40}H_{52}O_4$ , massa molar de 596,847 g/mol<sup>-1</sup> e um ponto de fusão de 182,5 ° C. Este carotenóide é lipofílico, mas solúvel em diclorometano, clorofórmio, acetona e metanol (EFSA, 2005; Quirós & Costa, 2006; Zavaleta, 2010). O número de registro CAS da astaxantina é o 472-61-7 e o número da base de dados da Comissão Europeia (CE) é o 207-451-4 (EFSA, 2005).

A astaxantina tem um comprimento de onda máximo de absorção característico de 503 nm, em sulfureto de carbono, 472 nm, em metanol, 466-467 nm, em hexano, e 485 nm, em clorofórmio. A estrutura química da astaxantina é caracterizada por uma longa cadeia hidrocarbonada, com duplas ligações conjugadas (cadeia poliénica) com um anel aromático em cada extremidade de cadeia (EFSA, 2005; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Augustini, 2007). Nos terminais da cadeia poliénica encontram-se, em cada anel benzénico, o grupo hidroxilo (OH) e o grupo carbonilo/cetónico (=O). A presença destes grupos explica algumas particularidades deste carotenóide, tais como, a capacidade de ser esterificado, um carácter mais polar que os outros antioxidantes e a elevada capacidade antioxidante (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006). A estrutura molecular da astaxantina livre é apresentada na Figura 3.



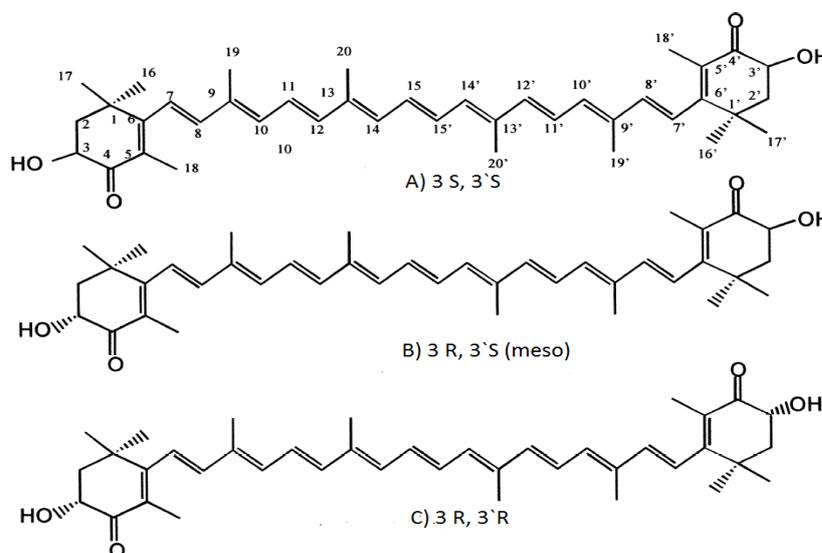
**Figura 3** Estrutura molecular da astaxantina livre. Os átomos de carbono assimétricos estão representados nos números 3 e 3', respectivamente (EFSA, 2005).

A astaxantina deriva do  $\beta$ -caroteno por 3-hidroxilação e de 4-cetolização em ambos os grupos terminais. Estas reacções são catalisadas pelas enzimas  $\beta$ -caroteno-hidroxilase e a  $\beta$ -caroteno cetolase, respectivamente. A hidroxilação ocorre em plantas, mas a cetolização é restrita em algumas bactérias, fungos e algumas algas verdes unicelulares (Seabra & Pedrosa, 2010).

A molécula de astaxantina apresenta dois carbonos assimétricos nas posições C3 e C3' nos anéis benzénicos, tal como é evidenciado na Figura 3. Os enantiómeros desta molécula são o resultado das diferentes formas em que os grupos hidroxilo se unem aos centros assimétricos dos átomos de carbono. Desta forma, existem três estereoisómeros da molécula de astaxantina: um par de enantiómeros (3R, 3'R e 3S, 3'S), com actividade óptica oposta, e a forma meso (3R, 3'S), opticamente inactiva (EFSA, 2005; Higuera-Ciagara *et al.*, 2006; Seabra & Pedrosa, 2010). Quando o grupo hidroxilo está acima do plano da molécula, denomina-se “configuração R” e quando o grupo hidroxilo está abaixo desse plano, é denominado “configuração S” (EFSA, 2005).

Na natureza, o isómero 3S, 3'S-astaxantina é o mais abundante, sendo que, diferentes organismos produzem estereoisómeros de astaxantina em diferentes ratios (Zavaleta, 2010; Seabra & Pedrosa, 2010).

Por exemplo, a astaxantina sintética tem uma proporção estereoisométrica de 1:2:1 para os isómeros (3R, 3'R), (3R, 3'S) e (3S, 3'S), respectivamente (Zavaleta, 2010; Seabra & Pedrosa, 2010), conforme pode ser observado na Figura 4.



**Figura 4** Isómeros configuracionais da molécula de astaxantina (Higuera-Ciagara *et al.*, 2006)

De acordo com a origem, a astaxantina pode ser esterificada, formando monoésteres ou diésteres, com ácidos gordos, tais como, ácido palmítico, ácido oleico, linoleico, mas também pode ser livre, ou seja, sem os grupos hidroxilo esterificados. Contudo, a

astaxantina livre é consideravelmente mais instável e particularmente susceptível à oxidação. A astaxantina também pode encontrar-se complexada a proteínas (carotenoproteínas) e a lipoproteínas (caroteno-lipoproteínas), sendo que estes complexos dão estabilidade à astaxantina. A astaxantina sintética não é esterificada, por outro lado, a astaxantina presente nas algas é sempre esterificada. No caso dos crustáceos contêm uma mistura das três formas acima mencionadas (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Zavaleta, 2010; Seabra & Pedrosa, 2010).

### 1.3.2 Estabilidade

Na molécula de astaxantina, em cada ligação dupla da cadeia poliénica podem existir duas configurações, como os isómeros geométricos *cis* ou *trans*. Os isómeros *cis* são termodinamicamente menos estáveis do que os isómeros *trans*, e possuem menor actividade biológica. A maioria dos carotenóides presentes na natureza são predominantemente isómeros *trans* (EFSA, 2005; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Seabra & Pedrosa, 2010). Sendo que, a molécula *all-trans*-astaxantina é mais estável que outros isómeros de configuração *cis*. Os isómeros *all-trans*-astaxantina podem converter-se facilmente em misturas de *cis-trans*, especialmente a 9-*cis* e 13-*cis* quando expostos a factores de oxidação (Yuan *et al.*, 1999; Seabra & Pedrosa, 2010). É de notar que, a *trans*-astaxantina é, quantitativamente, o carotenóide mais prevalente nos crustáceos (EFSA, 2005).

A oxidação da astaxantina deve-se, maioritariamente, à presença de oxigénio, que provoca a quebra de ligações duplas da cadeia poliénica e conseqüentemente a perda de cor e a diminuição das funções biológicas. Outros factores que estimulam o processo de degradação da astaxantina são a luz, temperaturas superiores a 40°C e o contacto com ácidos, bases e metais. Por outro lado, a oxidação pode ser inibida por antioxidantes tais como, os tocoferóis (vitamina E) e o ácido ascórbico (EFSA, 2005; Zavaleta, 2010).

O processo de isomerização de *trans*-astaxantina para isómeros *cis*, em solventes orgânicos, foi investigada por Yuan *et al.* (1999). A *trans*-astaxantina foi dissolvida em dimetilsulfóxido, diclorometano, clorofórmio, acetona, metanol, acetonitrilo e uma mistura de diclorometano e metanol (25:75), respectivamente, e aquecida a 35°C seguida de análise das *cis* e *trans*-astaxantinas nas soluções, usando a técnica de HPLC. As taxas de isomerização da *trans*-astaxantina foram dependentes do solvente utilizado, sendo que a taxa de isomerização foi diminuindo pela seguinte ordem: diclorometano > clorofórmio > diclorometano: metanol (25:75) > metanol > acetonitrilo > acetona > dimetilsulfóxido. Este

estudo também evidenciou que para inibir a reacção de isomerização deve-se evitar dissolventes clorados. Além disso, as temperaturas elevadas promovem, significativamente, a isomerização da *trans*-astaxantina.

Tendo em conta a instabilidade da astaxantina, houve a necessidade de investigar formas de proteger a estabilidade desta molécula e, portanto, as suas funções biológicas. Por exemplo, os carotenóides utilizados como aditivos na alimentação animal são, normalmente, tratados especificamente para protegê-los durante o armazenamento e posterior incorporação no alimento (Kittikaiwan *et al.*, 2007).

Foram desenvolvidos derivados de astaxantina com melhor estabilidade e solubilidade, visto que a instabilidade e a limitada solubilidade da astaxantina diminuam as suas aplicações. Os exemplos incluem vários ésteres de astaxantina, tais como, succinato dissódico de astaxantina, difosfato tetrassódico de astaxantina e diferentes ácidos gordos esterificados na molécula de astaxantina (Tachaprutinun *et al.*, 2009).

Além das estratégias acima mencionadas baseadas na modificação estrutural da molécula de astaxantina para conferir uma maior estabilidade foram estudadas outras estratégias, tais como, encapsulamento da astaxantina em nanoesferas poliméricas (Tachaprutinun *et al.*, 2009), inclusão de um complexo de astaxantina com hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) (Yuan *et al.*, 2008), complexação com iões de cálcio (Chen *et al.*, 2007), microencapsulação em matriz de quitosano (Higuera-Ciapara *et al.*, 2004), encapsulamento das células de *Haematococcus pluvialis*, com astaxantina, recobertas com quitosano (Kittikaiwan *et al.*, 2007).

A microencapsulação é realizada através de uma matriz polimérica em torno da molécula de forma a proteger a sua função biológica dos factores ambientais, tais como, a luz, ar e humidade. Baseia-se também na preparação de uma emulsão, que é colocado entre o carotenóide e a matriz polimérica, e em seguida submetida a um processo de secagem (Pu, 2010a).

### 1.3.3 Função Biológica: actividade antioxidante

Actualmente existe um considerável interesse no papel dos carotenóides devido às suas propriedades antioxidantes, nomeadamente, como agente protector que ajuda o organismo na redução dos danos oxidativos. É relatado que, os carotenóides permitem retardar ou prevenir doenças degenerativas, o envelhecimento e doenças oculares. Vários trabalhos de investigação referem que os efeitos protectores da astaxantina contra algumas enfermidades estão relacionados com o seu elevado potencial antioxidante (Naguib *et al.*, 2000; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Róldan & Mach, 2012).

As reacções de oxidação podem produzir radicais livres, que iniciam reacções em cadeia que danificam as células. O metabolismo aeróbio normal do organismo gera moléculas oxidantes, isto é, radicais livres (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Róldan & Mach, 2012).

Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais electrões desemparelhados, ou seja, tem orbitais com apenas um electrão. Sob esta forma, o composto apresenta uma forte reactividade com a maioria das espécies químicas (Ferreira *et al.*, 2007). Os radicais livres derivados de oxigénio são genericamente conhecidos como “espécies reactivas de oxigénio” (ROS) e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo. No entanto, não abrange apenas radicais livres de oxigénio, mas também espécies químicas não radicalares com potencial oxidante. As espécies reactivas de oxigénio mais relevantes são apresentadas na Tabela 3 (Ferreira *et al.*, 2007; Magalhães, 2009). Também existem radicais que contêm azoto designados por “espécies reactivas de azoto” (RNS) (Ferreira *et al.*, 2007; Fassett *et al.*, 2009).

**Tabela 3** Espécies reactivas de oxigénio (ROS).

Radicais livres		
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo	Espécie mais reactiva
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido	Altamente reactivo, com baixa solubilidade em lípidos.
ROO <sup>•</sup>	Radical peróxido	Peroxidação de lípidos
RO <sup>•</sup>	Radical alcóxido	Peroxidação de lípidos
Espécies não radicalares		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio	Agente oxidante
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigénio Singlete	Forma peróxidos ao reagir com lípidos das membranas celulares

As mitocôndrias são uma das principais fontes de ROS, mas são também um dos primeiros alvos de ataque destes radicais, visto que têm fácil acesso aos lípidos da membrana ocorrendo um fenómeno designado por peroxidação lipídica e que promove a formação de vários tipos de ROS (Pashkow *et al.*, 2008; Silva, 2010; Pu, 2010a). Quando existe a produção excessiva de radicais livres, designado por stresse oxidativo, resulta primeiro na danificação de lípidos insaturados das membranas celulares (peroxidação lipídica) e posteriormente significativos danos em proteínas, enzimas e DNA (Ferreira *et al.*, 2007).

O stresse oxidativo pode ocorrer devido a causas naturais, como situações de exercício físico extremo, processos de inflamação ou por causas não naturais como a presença de xenobióticos. Desta forma, o stresse oxidativo pode estar envolvido em processos de mutagénese, carcinogénese, processos inflamatórios, envelhecimento, arteriosclerose, entre outros. É de notar que, o organismo produz, a nível celular, defesas antioxidantes que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas, porém podem não ser suficientes para fornecer protecção adequada contra o stresse oxidativo (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007)

Os antioxidantes são moléculas capazes de retardar ou prevenir a oxidação de outras moléculas, ou seja, retardam ou previnem reacções químicas de transferência de electrões de uma substância para um agente oxidante, evitando a produção de radicais livres. Os carotenóides são fitoquímicos com propriedades antioxidantes que podem proteger as células do stresse oxidativo bloqueando radicais livres capazes de causar dano celular (Ferreira *et al.*, 2007; Róldan & Mach, 2012).

A astaxantina é um excelente antioxidante, que atraiu grande interesse devido às suas propriedades e pelo seu valor económico com aplicações na aquacultura, indústria farmacêutica e de nutracêuticos (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Paskow *et al.*, 2008).

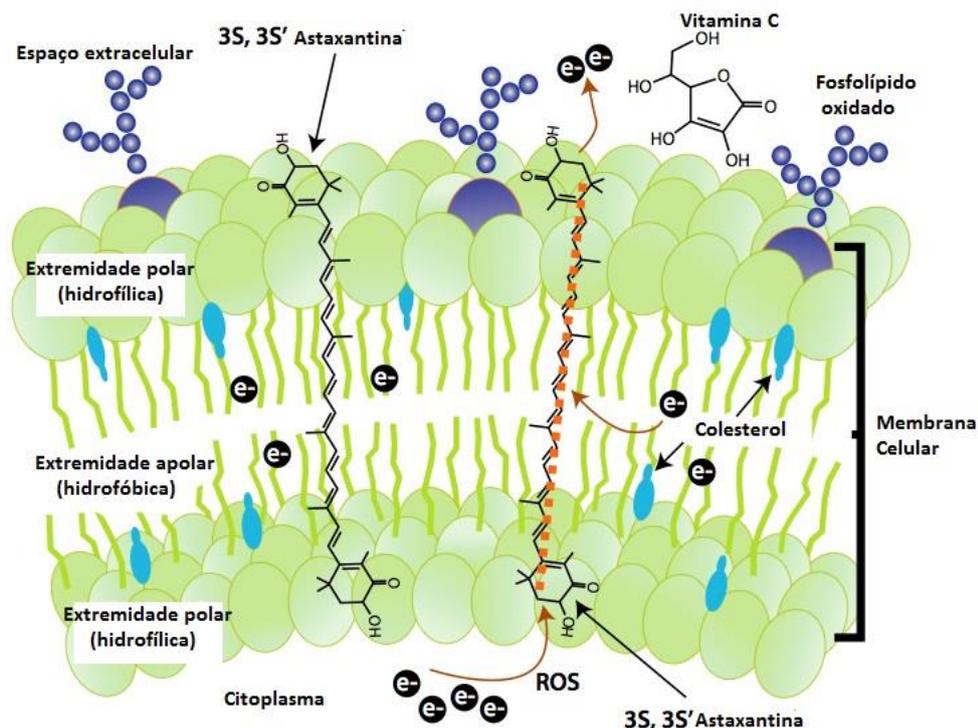
Foi demonstrado, em estudos *in vitro*, que a astaxantina tem uma actividade antioxidante 10 vezes superior ao  $\beta$ -caroteno e 100-500 vezes mais que a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). Por ordem decrescente de actividade antioxidante temos a astaxantina, cantaxantina, luteína =  $\beta$ -caroteno (Roldán & Mach., 2012; Sanches-Silva *et al.*, 2012b). Naguib *et al.* (2000) demonstraram que a actividade antioxidante, sobre os radicais peróxido, da astaxantina, luteína, licopeno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol é de 1.3, 0.4, 0.4, 0.5, 0.2, e 0.9, respectivamente. Como se verifica, a astaxantina apresenta uma actividade antioxidante superior a outros componentes activos, o que lhe permite um efeito protector

acrescido em doenças crónicas como a diabetes mellitus, doenças hepáticas e neurodegenerativas e o cancro (Naguib *et al.*, 2000; Róldan & Mach, 2012).

Em termos gerais, a actividade antioxidante dos carotenóides aumenta com o número de ligações duplas conjugadas e com os grupos funcionais ligados aos anéis da extremidade da cadeia (Uenojo *et al.*, 2007).

A maior actividade antioxidante da astaxantina está relacionada com a estrutura química da astaxantina, onde os anéis polares (com grupos cetónicos e hidroxilo) ligam-se a espécies reactivas de oxigénio na superfície, enquanto a cadeia poliénica actua no interior da membrana celular, como é possível verificar na Figura 5 (Pashkow *et al.*, 2008; Róldan & Mach, 2012).

As propriedades estruturais da astaxantina (não é estritamente hidrofóbica ou hidrofílica) permitem colocar-se num local estratégico na membrana celular, protegendo tanto a parte interior como a superfície externa da membrana dos danos oxidativos, assim como, conferindo rigidez à membrana. Isto acontece devido à cadeia poliénica e aos seus anéis terminais, que além de captarem espécies reactivas de oxigénio, possuem a capacidade de modificar a permeabilidade da membrana. Como se pode verificar na Figura 5, o alinhamento da molécula de astaxantina na membrana celular facilita a transferência dos electrões através das ligações duplas da cadeia. O alinhamento intramembranoso da astaxantina também permite a possível aproximação da vitamina C, que aceita os radicais livres gerados de forma eficaz (Pashkow *et al.*, 2008; Róldan & Mach, 2012)



**Figura 5** Mecanismo de ação antioxidante da astaxantina em membranas biológicas (Pashkow *et al.*, 2008)

A aplicação da astaxantina em nutracêuticos, principalmente como antioxidante na prevenção e tratamento de várias doenças tem ganho grande importância, principalmente em doenças carcinogénicas (Yasui *et al.*, 2011), cardiovasculares (Monroy-Ruiz *et al.*, 2011), neurodegenerativas (Lin *et al.*, 2010), assim como no efeito fotoprotector da pele (Camera *et al.*, 2009; Suganuma *et al.*, 2010), efeito protector do sistema ocular (Cort *et al.*, 2010) e no efeito anti-inflamatório (artrite reumatóide, aterosclerose, inflamações no intestino) (Fassett *et al.*, 2009).

É importante referir que, os estudos *in vitro* e em animais (ratos) provaram o efeito positivo da astaxantina em doenças inflamatórias crónicas, carcinogénicas, neurodegenerativas, gastrointestinais, hepáticas, síndromes metabólicas, doenças oculares e da pele. Estudos em humanos demonstraram o efeito da astaxantina no melhoramento de parâmetros antioxidantes, anti-inflamatórios, diminuição de espécies reactivas de oxigénio, melhoramento da proporção de lípidos no sangue, melhoramento da fertilidade masculina e de alguns parâmetros oftalmológicos (Róldan & Mach, 2012).

### 1.3.4 Astaxantina sintética e natural

De acordo com a origem, os corantes podem ser classificados em dois grupos: naturais e sintéticos. Os corantes sintéticos são idênticos aos gerados pela natureza, mas são produzidos por síntese química. Por outro lado, os corantes naturais são sintetizados por animais ou plantas. Actualmente há uma tendência de preferir os corantes naturais em vez dos sintéticos, pois em termos gerais são mais seguros sob o ponto de vista de saúde pública (Delgado-Vargas *et al.*, 2003).

Na Europa, a EFSA faz a avaliação da segurança dos aditivos naturais e sintéticos onde envolve a análise de dados biológicos e toxicológicos revelantes relativos à toxicocinética e toxicidade sub-crónica, genotoxicidade, carcinogenicidade e toxicidade na reprodução e desenvolvimento. São também analisados dados relativos às características do próprio aditivo, processo de manufactura, propriedades químicas (estabilidade, reactividade) e avaliações de exposição. Da análise dos dados toxicológicos estabelece-se ou corrige-se o valor da Dose Diária Admissível (DDA), expresso em mg/peso do corpo/dia, que é uma estimativa da quantidade de aditivo que poderia ser consumida todos os dias durante toda a vida, sem risco significativo para a saúde (ASAE, 2013).

Embora a astaxantina, na União Europeia (UE), possua um número-E (nomenclatura definida para aditivos após aprovação pela EFSA), é apenas restrito à alimentação animal como a truta e salmão (EFSA, 2005). A Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de astaxantina na alimentação de galinhas poedeiras e na aquacultura (principalmente salmão, truta e camarão) no ano de 1987 (Róldan & Mach, 2012).

A astaxantina sintética contém astaxantina livre (não esterificada) com uma mistura (1:2:1) dos isómeros (3S, 3'S), (3R, 3'S) e (3R, 3'R). Actualmente é a principal fonte de astaxantina na aquacultura (EFSA, 2005). Os maiores produtores de astaxantina sintética são a Roche-DSM (Suíça), com o produto Carophyll pink<sup>®</sup>, e a BASF (Alemanha) (Róldan & Mach, 2012).

Contudo, o elevado custo dos carotenóides sintéticos e a crescente demanda por corantes naturais, tem estimulado a procura de fontes naturais de astaxantina com potencial de utilização. Apenas algumas fontes de origem natural têm conseguido competir com a astaxantina sintética, como a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma* (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006; Róldan & Mach, 2012).

### 1.3.5 Principais fontes naturais

#### 1.3.5.1 Microalgas

A microalga *Haematococcus pluvialis* unicelular, verde, fotossintética, de água doce, da classe Chlorophyceae, é conhecida como a melhor fonte natural de astaxantina e actualmente é cultivada à escala industrial (Guerin *et al.*, 2003; Seabra *et al.*, 2010).

A *H. pluvialis* é capaz de acumular uma quantidade superior de astaxantina comparada com outras fontes naturais (Guerin *et al.*, 2003), uma vez que é capaz de acumular em torno de 1,5 a 3,0% de astaxantina em relação ao seu peso seco. Segundo Domínguez-Bocanegra *et al.* (2004), a produção máxima de astaxantina pela alga *H. pluvialis* foi de 98000µg/g de biomassa. Desta forma, tem ganho grande aceitação na aquacultura, ração para galinhas e no mercado nutracêutico mundial.

A microalga *H. pluvialis* foi aprovada nos EUA, Japão e Canadá como aditivo, em aquacultura, nas dietas de salmão, truta, camarão, pargo e peixes ornamentais, assim como, em suplementos alimentares para humanos. A Naturose™ é o nome comercial de uma fonte natural de astaxantina obtida através da microalga *H. pluvialis* produzida nos EUA pela *Cyanotech Corporation*, para aplicação na aquacultura de peixes (Cysewski *et al.*, 2000). Na União Europeia é autorizada essa fonte de astaxantina em suplementos alimentares para humanos. Por exemplo, o suplemento alimentar para humanos Astaxin®, cápsulas com 4 mg de astaxantina, é produzido na Suécia pela companhia BioReal (AstaReal, 2013).

Na microalga *H. pluvialis*, a forma esterificada da astaxantina é predominante, principalmente na forma monoéster. A astaxantina presente é aproximadamente 70% monoéster, 25% diéster e 5% livre (Cysewski *et al.*, 2000). A astaxantina livre e esterificada encontram-se principalmente como isómeros 3S, 3'S. Outros carotenóides presentes em baixa quantidade são a luteína, cantaxantina e o β-caroteno (Cysewski *et al.*, 2000; Ghiggi, 2007; Róldan & Mach, 2012).

Inúmeros estudos estudam as microalgas, particularmente a *H. pluvialis*, com o objectivo de otimizar o processo de obtenção de astaxantina (Hata *et al.*, 2001; Domínguez-Bocanegra *et al.*, 2004; Ghiggi, 2007).

A produção de astaxantina é induzida por condições de stresse durante o crescimento da microalga (deficiência nutricional, excesso de irradiação, etc.), as células enquistam e a astaxantina acumula-se no citoplasma, em grandes quantidades, de tal forma que a cor muda de verde para vermelho. Assim, o sistema de produção a larga escala

adoptou duas fases (Cavalheiro et al., 1999). Na primeira fase de produção, o crescimento rápido da microalga realiza-se em fotobioreactores em condições ideais, a segunda fase consiste na alteração dessas condições promovendo o stresse, sendo essa fase designada por carotenogénese. Posteriormente é promovido o rompimento celular de forma a aumentar a biodisponibilidade de astaxantina, visto que os esporos intactos apresentam baixa digestibilidade. Por fim, a biomassa é seca e directamente encapsulada ou extraída para ser incluída em formulações de nutracêuticos (Guerin et al., 2003; Higuera-Ciagara et al., 2006; Ghiggi, 2007).

Existem outras espécies de algas propostas como fontes de astaxantina e outros carotenóides, como as algas *Chrorella vulgaris* e *Chlorococcum sp.*, mas sem muito sucesso comparada com a microalga *H. pluvialis* (Higuera-Ciagara et al., 2006).

O elevado custo de produção da *H. pluvialis* é umas limitações na aplicação industrial (Cysewski et al., 2000). Além disso, Sommer et al. (1991) referem que o uso de esporos lisados da alga *H. pluvialis* em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) teve baixa eficiência devido à elevada percentagem de esterificação e por apresentar uma ruptura incompleta dos esporos. Outro estudo evidenciou que a astaxantina sintética Carophyl pink<sup>®</sup> teve maior eficiência do que a astaxantina da alga *H. pluvialis*, na dieta de truta *Oncorhynchus mykiss* (Mendes-Pinto et al., 2004).

Esta microalga também tem uma baixa taxa de crescimento, sendo um dos principais problemas na produção industrial. Apesar de haver estudos sobre as condições ideais no crescimento em biomassa e produção de astaxantina, muitas dessas informações são de difícil acesso e reprodutibilidade por constituírem segredo comercial ou industrial (Cavalheiro et al., 1999).

### 1.3.5.2 Leveduras

Há mais de duas décadas que a levedura *Phaffia rhodozyma*, pertencente à família Cryptococaceae, tem sido amplamente estudada devido à sua capacidade de produzir astaxantina, tanto que actualmente é a levedura com maior importância comercial. Produz astaxantina e outros carotenóides ( $\alpha$ -caroteno e  $\gamma$ -caroteno) a partir da fermentação de açúcares sob condições controladas (Higuera-Ciagara et al., 2006; Yang et al., 2011).

Muitos estudos têm focado o efeito de diferentes nutrientes ou fontes de carbono, no meio de cultura, sobre a produção de biomassa de levedura e astaxantina (Chociai et al.,

2002; Moriel, 2004; Yang *et al.*, 2011). Outros autores interessaram-se pelo estudo da optimização das condições de forma a obter maiores rendimentos de astaxantina (Ramirez *et al.*, 2001; Moriel, 2004). Além disso, há investigadores que se têm centrado na utilização de estirpes geneticamente melhoradas para aumentar o rendimento de produção de astaxantina (Calo *et al.*, 1995). Uma característica particular na astaxantina, com origem na levedura *P. rhodozyma*, é o facto de se apresentar na forma livre e como isómeros 3R, 3'R (Moriel, 2004; EFSA, 2005).

As estirpes selvagens da levedura *P. rhodozyma* apresentam em torno de 500 µg de carotenóides totais por grama de biomassa, dos quais 40% a 95% são astaxantina (Johnson *et al.*, 1991). No entanto, a partir de estirpes geneticamente melhoradas consegue-se produzir mais de 10000 µg de astaxantina por grama de biomassa, e podem ser inoculadas à escala industrial (Johnson, 2003). Contudo, é de notar que os custos actuais são elevados devido à menor produção de estirpes selvagens, assim como a falta de meios de cultura mais baratos que suportem um processo a larga escala (Zavaleta, 2010). Além disso, a astaxantina encontra-se protegida pela parede celular da levedura *P. rhododzyma* a qual deve ser rompida por processos mecânicos ou enzimáticos, com o objectivo de tornar a astaxantina disponível. Em estudos de pigmentação com *P. rhodozyma*, em dietas de salmonídeos, crustáceos e ovos de galinha indicam a importância de romper a parede celular para aumentar a biodisponibilidade (Johnson *et al.*, 1980; Shahidi & Brown, 1998).

Na União Europeia (EU), a astaxantina a partir da levedura *P. rhodozyma* é aprovada apenas como aditivo (E161y e 161z) em dietas de salmão e truta (EC, 2004; EC, 2007). O produto comercial Ecotone<sup>®</sup> é constituído por astaxantina da levedura *P. rhodozyma* usado na alimentação de salmão e truta (EFSA, 2004).

### **1.3.5.3 Subprodutos de crustáceos**

Os subprodutos de crustáceos são gerados através de operações de processamento industrial de camarão, caranguejos, lagostas e lagostins. Normalmente, estes subprodutos são eliminados como resíduos. Assim além da perda destes subprodutos valiosos, também podem estar em causa graves problemas ambientais devido à sua decomposição. A eliminação dos subprodutos gera custos adicionais, reduzindo a margem de lucro do sistema de produção (Carranco *et al.*, 2003; López-Cervantes *et al.*, 2006a; Nuñez-Gastélum *et al.*, 2011; Herrera-Andrade *et al.*, 2011).

Segundo Carranco *et al.* (2003) apenas 50% da do camarão é comestível. Os restantes 50% são constituídos pelo cefalotórax e o exoesqueleto, e representam cerca de 35000 toneladas anuais de desperdícios.

No Louisiana, Estados Unidos da América, existe a maior, mais antiga e sucedida indústria de aquacultura de lagostim *P. clarkii*. A aquacultura destes crustáceos tem crescido exponencialmente desde a década de 70. Pratos populares designados por “Cajun” e o desenvolvimento de diversos pratos *gourmet* com o lagostim *P. clarkii* contribuíram para o significativo desenvolvimento da indústria. Além da aquacultura, também são feitas colheitas de lagostins em lagoas e pântanos, através do uso de armadilhas com iscos, designando-se por culturas selvagens (Meyers *et al.*, 1990).

Desde de 1981, que são estudados processos industriais para a recuperação local dos subprodutos do lagostim, revolucionando assim a indústria tradicional. A eliminação dos resíduos de lagostim (cefalotórax, exoesqueleto) em aterros de deficiente controlo tem custado ao estado do Louisiana dezenas de milhões de dólares anualmente, além de criar sérios problemas ambientais localmente (Meyers & Chen, 1982b; Meyers & Chen, 1983; Meyers *et al.*, 1990).

Os subprodutos de crustáceos têm sido reportados, em vários estudos, como uma excelente fonte de proteína, quitina, vitaminas, sais minerais, ácidos gordos insaturados (ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido linolénico) e carotenóides (principalmente astaxantina) (Ogawa *et al.*, 2000; Cremades *et al.*, 2001; Carranco *et al.*, 2003; Pérez-Gálvez *et al.*, 2008). Estes subprodutos consistem, de um modo geral, em (15%-35%) de sais minerais, (25-50%) de proteína, (25-35%) de quitina, lípidos e carotenóides (Higuera-Ciapara, *et al.*, 2006).

Os carotenóides dos subprodutos de crustáceos, principalmente a astaxantina, têm sido estudados e quantificados por diversos investigadores, como se pode verificar pela consulta da Tabela 4.

**Tabela 4** Quantidade de astaxantina presente em vários subprodutos de crustáceos (Adaptado de Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

Crustáceo	ATX livre (µg/g)	ATX total (µg/g)	ATX (%)			Outros carotenóides	Método	Fonte
			Livre	Monoéster	Diéster			
<b>Camarão</b>	36,5 <sup>a) h)</sup> 453,8 <sup>b)</sup>	ND	ND	ND	ND	-	UHPLC -DAD	Sanches-Silva <i>et al.</i> (2012b)
<b>Camarão</b>	1070-3160 <sup>b) d)</sup>	ND	ND	ND	ND	-	HPLC-DAD	López-Cervantes <i>et al.</i> (2006a)
<b>Camarão (Litopenaeus vannamei)</b>	2720 <sup>b) d)</sup>	ND	ND	ND	ND	-	Espectrofotómetro UV/vis	Núñez-Gastélum <i>et al.</i> (2011)
<b>Camarão P. monodon</b>	24,6 <sup>f) h)</sup>	74,6	33	51,3	16,2	β-caroteno Zeaxantina	HPLC-UV-vis	Sachindra <i>et al.</i> (2005a)
<b>P. indicus</b>	14,5 <sup>f) h)</sup>	33,1	43,9	28,9	27,1			
<b>P. stylifera</b>	19,7 <sup>f) h)</sup>	99,9	19,7	49,2	31,1			
<b>M. dobsoni</b>	27,7 <sup>f) h)</sup>	50,1	55,3	22,9	21,7			
<b>Camarão (Pandalus borealis)</b>	5,7 <sup>d)</sup>	147,7	3,9	19,72	74,3	Zeaxantina	Espectrofotómetro UV/vis	Shahidi & Synowiecki (1991)
<b>Camarão (Pandalus borealis)</b>	3,9 <sup>h) c)</sup>	49,7	8	22,5	69,5	-	Espectrofotómetro UV/vis	Torrissen <i>et al.</i> (1981)
<b>Camarão (Pandalus borealis)</b>	1,7 <sup>f) h)</sup> 1,3 <sup>c) f) h)</sup>	30,9 35,8	5,6 3,5	18,5 20,4	75,9 76,1	-	Espectrofotómetro UV/vis	Guillou <i>et al.</i> (1995)
<b>Caranguejo da neve (C. opilio)</b>	25,8 <sup>d)</sup>	119,6	21,6	5,1	56,6	Luteína, Zeaxantina Astaceno	Espectrofotómetro UV/vis	Shahidi & Synowiecki (1991)
<b>Caranguejo (C. opilio)</b>	17,9 <sup>f) d)</sup>	ND	ND	ND	ND	β-caroteno	HPLC- DAD	Vilaso-Martínez <i>et al.</i> (2008)
<b>Lagostim (P. clarkii)</b>	61,7 <sup>e) h)</sup>	153	40,3	49,4		Astaceno	Espectrofotómetro UV/vis	Meyers & Bligh (1981)
<b>Lagostim (P. clarkii)</b>	ND	203 <sup>c)h)</sup>	ND	ND	ND	-	Espectrofotómetro UV/vis	Meyers & Chen (1983)
<b>Lagostim (P. clarkii)</b>	ND	162,2 <sup>g)d)</sup>	ND	ND	ND	-	Espectrofotómetro UV/vis	Cremades <i>et al.</i> (2001)

a) Corresponde ao exoesqueleto, submetido a um processo de cozedura. b) A amostra sofreu um processo de fermentação. O valor corresponde à quantidade de astaxantina (µg) presente na fracção lipídica obtida (g). c) A amostra sofreu um processo de silagem ácida. d) Quantidade de astaxantina em µg por grama de massa seca. e) Corresponde ao exoesqueleto e cefalotórax, submetido a um processo de cozedura. f) Corresponde ao exoesqueleto. g) Corresponde aos carotenóides totais no lagostim inteiro. h) Amostra fresca. **ND**- Não determinado. **ATX**- Astaxantina

De acordo com a Tabela 4, existem variações no conteúdo de astaxantina total nos subprodutos de crustáceos. No caso do lagostim, *Procambarus clarkii*, varia entre 153 a 203 µg/g, sendo que estas variações podem estar na origem no teor de carotenóides disponível na dieta e também pelo uso de diferentes métodos de pré-tratamento e extracção da amostra (Shahidi & Synowiecki, 1991; Nunez-Gastélum *et al.*, 2011). No camarão, o conteúdo de astaxantina total varia entre 30,9 a 99,9 µg/g. Estas diferenças também podem estar associadas às diferentes espécies de camarão e ao método de pré-tratamento e extracção da amostra (Meyers & Chen, 1982b; Sachindra *et al.*, 2005a; Núñez-Gastélum *et al.*, 2011). É importante referir, que estes crustáceos são capturados em diferentes zonas geográficas, o que leva a diferenças na alimentação.

Nos crustáceos, a astaxantina pode encontrar-se na forma livre ou esterificada com ácidos gordos. Também pode encontrar-se combinada com proteínas, no exoesqueleto, formando carotenoproteínas. A coloração vermelha do exoesqueleto de crustáceos deve-se à presença de complexos da astaxantina com proteínas (Meyers & Chen, 1982b; Shahidi & Brown, 1998; Cremades *et al.* 2001; Seabra & Pedrosa, 2010). De acordo com a Tabela 4, o lagostim *P. clarkii* apresenta a elevada percentagem de astaxantina livre, cerca de 40,3% (61,7 µg/g). Na generalidade, o camarão apresenta uma percentagem de astaxantina livre, variável entre 3,5-55%.

Estes subprodutos também contêm pequenas quantidades de outros carotenóides, tais como, de luteína, zeaxantina, β-caroteno e astaceno (Tabela 4). O astaceno é a forma oxidada da astaxantina, ou seja, a astaxantina é convertida em astaceno durante etapas de saponificação e extracção (Meyers & Chen, 1982a; Ogawa, *et al.* 2007).

Segundo Sachindra *et al.* (2005a), a maior distribuição de carotenóides no corpo de quatro espécies de camarão foi encontrada no cefalotórax do *P. Stylifera* (153 µg/g) e no exoesqueleto (104,7µg/g), enquanto os componentes da espécie *P. indicus* demonstraram níveis mais baixos. Contudo, na generalidade das espécies analisadas, o exoesqueleto foi o componente que apresentou quantidades de carotenóides mais elevadas, conferindo a cor avermelhada característica da espécie. O estudo realizado por Sanches-Silva *et al.* (2012b), confirma essa conclusão, pois os resultados demostram que o exoesqueleto do camarão (espécie não evidenciada) é o componente mais concentrado em astaxantina (22,1 µg/g), seguidamente o cefalotórax (16,4 µg/g) e a parte edível (3,8 µg/g).

Vários estudos têm demonstrado que a pigmentação de salmonídeos, em aquacultura, pode ser conseguida pela inclusão de crustáceos ou subprodutos de crustáceos processados na sua dieta (Torrissen *et al.*, 1981; Meyers & Chen, 1982b; Guillou *et al.*, 1995; Shahidi & Brown, 1998; EFSA, 2005; Ogawa *et al.*, 2007). No entanto, problemas relacionados com a preparação do aditivo podem ser encontrados quando o crustáceo inteiro ou os subprodutos são formulados nas dietas. Os problemas com o uso directo na alimentação de subprodutos de crustáceos incluem, níveis variáveis de carotenóides, susceptibilidade à deterioração, elevado custo de transporte e elevado teor de quitina (Torrissen *et al.*, 1981; Guillou *et al.*, 1995; Higuera-Ciajara *et al.*, 2006).

Uma forma de processamento dos subprodutos é através da transformação da biomassa num aditivo para formulações alimentares de salmonídeos. O processamento de subprodutos em farinha reduz o volume e a instabilidade.

No entanto, os métodos de secagem, que dependem da aplicação de calor, não são adequados devido à elevada susceptibilidade de degradação oxidativa dos carotenóides sob determinadas condições de processamento térmico (Guillou *et al.*, 1995; Shahidi & Brown, 1998). A redução do teor de carotenóides causada pelo processo de secagem, leva por conseguinte a taxas de inclusão em dietas de salmonídeos, tão alta quanto 20% para fornecer a pigmentação desejável (Meyers & Chen, 1983). Uma desvantagem adicional é o elevado teor de cinzas, com origem no carbonato de cálcio existente no exoesqueleto. Por outro lado, a quitina diminui significativamente a digestibilidade da astaxantina em salmonídeos e limita severamente a taxa de adição de subprodutos nas formulações para salmonídeos (Meyers & Chen, 1983; Guillou *et al.*, 1995; Shahidi & Brown, 1998).

De forma a evitar este problema têm sido concebidos métodos alternativos, tais como a silagem ácida, a fermentação e a extracção de pigmentos com solventes orgânicos e óleos comestíveis (Meyers & Chen, 1983; Guillou *et al.*, 1995; Cremades *et al.*, 2001; Sachindra *et al.*, 2006; Herrera-Andrade *et al.*, 2011).

Da mesma forma, a recuperação do complexo estável proteína-carotenóide (carotenoproteínas) também tem sido demonstrado ser viável, proporcionando uma excelente fonte de pigmentos e aminoácidos (Cremades *et al.*, 2003). O uso destes processos depende do custo de produção e da quantidade de astaxantina obtida. Além disso, é preciso ter em conta que nalguns processos de extracção produzem-se isómeros e derivados de astaxantina que não podem ser absorvidos por salmonídeos (EFSA, 2005).

A literatura mostra também uma menor digestibilidade, nos salmonídeos, para a astaxantina esterificada em comparação com a astaxantina livre (Storebakken *et al.*, 1987; White *et al.*, 1998; Bowen *et al.*, 2002). A hidrólise das ligações éster é um processo limitante na biodisponibilidade de astaxantina na truta e no salmão (White *et al.*, 1998; Shahidi & Brown, 1998).

### **1.3.6 Aplicações da astaxantina**

#### **1.3.6.1 Alimentação de Salmonídeos**

A astaxantina não pode ser sintetizada *de novo* por peixes, especialmente salmonídeos. A concentração da astaxantina no músculo de salmonídeos depende da ingestão e de uma eficiente absorção através de fontes exógenas (Mendes-Pinto *et al.*, 2004).

Na generalidade, existe um consenso na literatura de que a astaxantina é importante para a saúde dos salmonídeos e crustáceos (Meyers, 2000; Torrissen *et al.*, 1995). A coloração laranja avermelhada dos salmonídeos e crustáceos é um parâmetro fundamental na aceitação do consumidor e que determina o seu valor comercial (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

A intensidade de pigmentação depende da quantidade de carotenóides retidos no músculo, o que varia com vários factores fisiológicos, tais como, o peso do peixe, taxa de crescimento, maturação e factores genéticos, visto que algumas espécies apresentam selectividade na absorção de carotenóides. A fonte da astaxantina, a concentração, a forma livre ou esterificada, a composição estereoisomérica e o conteúdo de lípidos na dieta dos salmonídeos também pode influenciar a intensidade de pigmentação (Torrissen *et al.*, 1995; Meyers, 2000; Bowen *et al.*, 2002; Kalinowski *et al.*, 2007).

Além da astaxantina na dieta melhorar a pigmentação de salmonídeos, também tem sido demonstrado um melhoramento no desempenho de funções específicas na reprodução e metabolismo. No caso da reprodução, a astaxantina acelera a maturidade sexual, aumenta a fertilidade e a taxa de sobrevivência dos ovos e um melhor desenvolvimento embrionário (EFSA, 2005; Higuera-Ciapara *et al.*, 2006).

Outros estudos evidenciaram que a astaxantina é um potente antioxidante, *in vivo* e *in vitro* na inibição da peroxidação lipídica (Kurashige *et al.* 1990; Tejera *et al.*, 2007). A astaxantina também desempenha a função provitamina A em salmonídeos (Meyers, 2000; EFSA, 2005).

A FDA autorizou o uso da astaxantina como aditivo (corante alimentar) na alimentação de salmonídeos em 1987 (FDA, 2011; Róldan & Mach, 2012). No mercado da UE os produtos disponíveis, para aplicar em aquacultura, tem origem sintética e da levedura *Phaffia rhodomyma*. Sendo que, o valor máximo adicionado de aditivo não deve exceder os 100 mg/kg de alimento completo. A mistura de cantaxantina com astaxantina é permitida desde que o total de concentração não exceda também os 100 mg/kg (EFSA, 2005).

### **1.3.6.2 Embalagens activas**

A aplicação da astaxantina de origem natural (subprodutos de camarão) em embalagens activas tem sido investigada, devido à sua capacidade antioxidante. As embalagens activas permitem modificar as condições do alimento embalado de forma a aumentar a sua vida útil, melhorar a segurança alimentar ou as propriedades sensoriais, mantendo a qualidade do alimento (Sanches-Silva *et al.*, 2010a).

Segundo o Regulamento (CE) nº1935/2004 materiais activos são concebidos de forma a incorporarem deliberadamente componentes “activos” (como o caso da astaxantina) destinados a ser libertados nos alimentos. O projecto de investigação “Preparação de embalagens activas com capacidade antioxidante e antimicrobiana baseadas em astaxantina e quitosano” teve como principal objectivo desenvolver uma metodologia que permita a incorporação de compostos de desperdícios de camarão (astaxantina e quitosano) em matrizes plásticas de polietileno e poliamida para a produção de embalagens activas com propriedades antioxidantes (astaxantina) e antimicrobianas (quitosano) de forma a aumentar o prazo de validade dos alimentos e a sua segurança (Sanches-Silva *et al.*, 2010a; Sanches-Silva *et al.*, 2012b).

### **1.3.6.3 Saúde e Cosmética**

Os nutracêuticos são a principal forma de uso da astaxantina nos humanos. Devido às propriedades antioxidantes da astaxantina e ao efeito preventivo em doenças como o cancro, doenças crónicas inflamatórias, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, doenças da pele, entre outras, tem ganho grande importância como complemento dietético (Pashkow *et al.*, 2008; Fasset *et al.*, 2009; Róldan & Mach, 2012).

Em 1999 a astaxantina sintetizada pela alga *H. pluvialis* foi aprovada pela FDA como nutracêutico e cosmético, depois de avaliarem todos os efeitos potencialmente negativos no

consumo em humanos (Mera Pharmaceuticals, 1999; Guerin *et al.*, 2003; Róldan & Mach, 2012).

Várias empresas da Europa, Estados Unidos e Japão produzem suplementos de astaxantina para humanos. A quantidade de astaxantina nesses suplementos varia de 4 a 20 mg (Seabra & Pedrosa, 2010). Contudo, o consumo humano de astaxantina sintetizada pela levedura *Phaffia rhodozyma* geneticamente melhorada, não é autorizada na Europa, apenas é autorizado nos Estados Unidos com uma dose máxima de 2 mg/dia durante períodos limitados (Róldan & Mach, 2012).

Na Suécia é comercializado o produto Astavision<sup>®</sup>, obtido através da alga *H. pluvialis*, em cápsulas com 3 mg de astaxantina, e destina-se a melhorar a saúde dos olhos e sintomas de fadiga ocular (AstaReal, 2013). No estudo Suganuma *et al.* (2010) foi demonstrado que a astaxantina impede o fotoenvelhecimento da pele associado à radiação UVA, bem como a flacidez ou enrugamento da pele. Actualmente existe no mercado o produto sueco *Swedish Beauty Complexes* com astaxantina sintetizada por *H. pluvialis*, e destina-se a proteger a pele e a melhorar a performance muscular (AstaReal, 2013).

#### **1.3.6.4 Alimentação de galinhas poedeiras**

A utilização da astaxantina como aditivo na alimentação de galinhas poedeiras tem sido investigada, verificando-se a sua eficácia na intensificação da pigmentação da gema dos ovos, principalmente através de subprodutos de crustáceos (camarão, lagostim), algas e leveduras (Carranco *et al.*, 2003; EFSA, 2005; Pérez-Gálvez *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2012).

A coloração da gema de ovo é percebida como um parâmetro importante de qualidade e de aceitação dos consumidores. Dependendo da utilização final (ovos de mesa ou para indústria de processamento de alimentos), as exigências de cor serão diferentes e os produtores devem ser capazes de mudar esse atributo em função da procura do mercado (Delgado-Vargas *et al.*, 2003; Pérez-Gálvez *et al.*, 2008). As fontes naturais de carotenóides que têm sido incorporadas de forma a proporcionar a pigmentação dos ovos são o milho, farelo de milho e farinha de luzerna (Pérez-Gálvez *et al.*, 2008).

A procura por outras fontes naturais de corantes tem sido elevada. No caso de Carranco *et al.* (2003) investigaram o efeito da inclusão de cabeças de camarão *Penaeus sp.* (fonte de astaxantina) na alimentação de galinhas poedeiras. Foi provado que a inclusão de cabeças de camarão nas rações (10,20% e 25%) incrementou significativamente a cor da

gema dos ovos e a concentração de astaxantina dos mesmos. Também foi evidenciado que as concentrações usadas não afectaram variáveis de produção, assim como, a qualidade e o sabor do ovo.

Pérez-Gálvez *et al.* (2008) mostraram que é possível obter uma coloração mais intensa da gema de ovo através da introdução de farinha de lagostins *Procambarus clarkii* na alimentação de galinhas. Sendo que, em apenas três dias de suplementação, a coloração da gema ficou com uma cor laranja mais intensa.

Outro estudo, patenteado nos EUA, mostrou os vários efeitos da astaxantina sobre as galinhas poedeiras, onde se verificou uma diminuição da mortalidade dos frangos, aumento da fertilidade, aumento da produção de ovos e uma diminuição drástica das infecções por *Salmonella*, justificada pela formação de uma membrana mais forte (Lignell *et al.*, 1998; Cysewski, 2008). Por outro lado, Walker *et al.* (2012) estudaram a suplementação de galinhas com astaxantina e a vitamina E com o objectivo de obter ovos nutricionalmente enriquecidos.

Na Suécia, são produzidos ovos de galinha com o nome comercial “Kronaggs Guldgula” (ovos de ouro, gema dourada). A empresa responsável por colocar no mercado estes ovos alimenta as galinhas poedeiras com astaxantina natural obtida pela microalga *H. pluvialis*. São os únicos alimentos funcionais enriquecidos com astaxantina, onde a marca destaca no rótulo o elevado potencial antioxidante e a coloração dourada intensa da gema dos ovos (Cysewski, 2008).

#### **1.4 Métodos de avaliação da actividade antioxidante *in vitro***

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a actividade antioxidante *in vitro* de forma a permitir uma rápida selecção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças degenerativas (Duarte-Almeida *et al.*, 2006). Nos alimentos, os compostos antioxidantes agem de forma a protegê-los de fenómenos de oxidação, que estão relacionados com a deterioração, como o caso dos óleos e gorduras, e com perda de valor nutricional. Contudo, os compostos antioxidantes podem também prevenir a oxidação de estruturas biológicas (Antolovich *et al.*, 2002).

Tendo em conta o elevado interesse na determinação da actividade antioxidante de diversos compostos, várias metodologias *in vitro* foram propostas, com diferentes graus de complexidade, mecanismos e espécies reactivas envolvidas (Rodriguez-Amaya, 2010). No

entanto, não existe um sistema ideal de medição da actividade antioxidante de uma amostra. O tipo de solvente, a polaridade do solvente e do composto e a presença de compostos sem capacidade antioxidante podem alterar os resultados (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006).

Huang *et al.* (2005) consideraram inadequado e enganoso generalizar dados de um método como “actividade antioxidante total”, porque o que é medido num método reflecte apenas a reactividade química sob condições específicas aplicadas naquele ensaio. Desta forma, para obter uma avaliação da capacidade antioxidante válida é necessário usar vários métodos de forma a incluir diferentes mecanismos de inibição (Rodríguez-Amaya, 2010). Por esta razão, no presente trabalho optou-se por utilizar dois métodos para avaliar a actividade antioxidante.

Os antioxidantes podem manifestar comportamentos distintos aquando da reacção com diferentes radicais livres. Os ensaios analíticos para determinação da actividade antioxidante são classificados, de acordo com os mecanismos de reacção envolvidas, em dois grupos principais: os que envolvem a transferência de um electrão (SET) e os que envolvem a transferência de átomos de hidrogénio (HAT) (Prior *et al.*, 2005).

O exemplo de métodos baseados na transferência de um electrão é o caso do método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) expresso em TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox<sup>®</sup>); método DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo); quantificação de fenóis totais pelo método *Folin-Ciocalteu* e o método FRAP (poder redutor férrico) (Prior *et al.*, 2005; Castelo-Branco & Torres, 2011).

Estes métodos envolvem apenas dois componentes, os antioxidantes da amostra e o agente oxidante, sendo que a transferência de electrões ocorre de um composto antioxidante para um oxidante. Desta forma, é causada uma mudança na absorvância do composto oxidante, permitindo o acompanhamento da reacção e a determinação da capacidade antioxidante da amostra. Nestes ensaios o agente oxidante não precisa ser estritamente um radical livre e não se utilizam espécies reactivas de oxigénio (Prior *et al.*, 2005; Castelo-Branco & Torres, 2011).

É de notar que, de acordo com Prior *et al.* (2005) apesar dos métodos ABTS e DPPH serem classificados de acordo com a reacção de SET, estes dois radicais são capazes de ser neutralizados por antioxidantes, tanto por redução directa através da transferência de um

electrão (SET) ou por bloqueio do radical através transferência de átomos de hidrogénio (HAT).

Alguns exemplos de métodos que envolvem a transferência de átomos de hidrogénio são: ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigénio), o TRAP (capacidade sequestradora de radicais livres) e a inibição da oxidação do ácido linoléico. Os métodos baseados no mecanismo de HAT investigam a capacidade dos antioxidantes em bloquear a acção dos radicais peróxido (ROO<sup>•</sup>) através da doação de hidrogénio (Prioir *et al.*, 2005; Rodriguez-Amaya, 2010; Castelo-Branco & Torres, 2011).

Poucos são os estudos disponíveis sobre a determinação da actividade antioxidante em crustáceos. Os estudos existentes aplicam-se ao camarão e são recentes (Sachindra & Bhaska, 2008; Cheung *et al.*, 2012; Sowmya & Sachindra, 2012).

Sachindra & Bhaska (2008) determinaram a actividade antioxidante da fracção lipídica (liofilizada) de subprodutos de camarão fermentados, tendo o método ABTS apresentado melhores resultados relativamente ao método do DPPH, ou seja, os compostos antioxidantes presentes na amostra mostraram uma capacidade superior de bloqueio do radical ABTS<sup>•+</sup> comparativamente ao radical DPPH<sup>•</sup>.

No presente trabalho foram usados dois métodos, ABTS e DPPH, para a determinação da actividade antioxidante em amostras liofilizadas de lagostim *P. clarkii*, camarão selvagem e de aquacultura (*Penaeus sp.*).

## **1.5 Processos de extracção de astaxantina a partir de subprodutos de crustáceos**

No processo de extracção da astaxantina é importante, em primeiro lugar, considerar que se manuseia um composto sensível ao oxigénio, luz e temperatura. Desta forma, esses factores podem afectar directamente a qualidade e quantidade de astaxantina obtida (Delgado-Vargas *et al.*, 2003).

Em várias investigações têm sido desenvolvidos métodos de extracção da astaxantina a partir de subprodutos de crustáceos. Os mais comuns são aqueles que utilizam solventes orgânicos (Meyers & Bligh, 1981; Sachindra *et al.*, 2005a; López-Cervantes *et al.*, 2006a; Sachindra *et al.*, 2006; Sanches-Silva *et al.*, 2012b). Os carotenóides são alcenos, com várias ligações duplas, e conseqüentemente susceptíveis a reacções típicas deste grupo de compostos, tais como, reacções de oxidação e de halogenação. Assim, os solventes de

extracção utilizados devem estar livres de oxigénio, ácidos e halogéneos, de forma a evitar a degradação dos carotenóides. A selecção do solvente de extracção é muito importante de forma a obter extractos de boa qualidade, sendo que deve ter baixa volatilidade, inflamabilidade e toxicidade (Delgado-Vargas *et al.*, 2003).

Também tem sido proposta a utilização de fluidos supercríticos, como o CO<sub>2</sub>, para a extracção de carotenóides devido às vantagens associadas, tais como, processo de extracção mais rápido, uma vez que o processo de evaporação não é necessário, baixa toxicidade, baixo custo e aceitável em termos ambientais (Quirós & Costa, 2006). Este método de extracção tem sido usado para a extracção de astaxantina na alga *H. pluvialis* (Valderrama *et al.*, 2003), na levedura *P. rhodozyma* (Passos *et al.*, 2006) e em lagostim (López *et al.*, 2004). Outra vantagem relatada é o facto de o analito poder ser extraído a baixas temperaturas, evitando a potencial degradação dos compostos termolábeis (López *et al.*, 2004; Quirós & Costa, 2006). Contudo, o CO<sub>2</sub> apresenta baixa polaridade, fazendo com que a extracção de compostos polares seja dificultada (Quirós & Costa, 2006).

A extracção da astaxantina também pode ser feita através de óleos de origem vegetal (Meyers & Chen, 1982b; Sachindra & Mahendrakar, 2005b; Pu *et al.*, 2010b).

O principal problema na extracção ocorre quando os carotenóides se encontram associados a proteínas e à quitina, uma vez que essa associação dificulta o processo de extracção. Assim, foi aplicada a tecnologia enzimática, como pré-tratamento do extracto, de forma a permitir a hidrólise do complexo proteína-pigmento (Meyers & Chen, 1982b; Meyers & Chen, 1983; Armenta-López *et al.*, 2002a).

São também aplicadas outras metodologias como a silagem química (Meyers & Chen, 1983; Guillou *et al.*, 1995) e a silagem microbiana ou fermentação (López-Cervantes *et al.*, 2006; Sachindra *et al.*, 2007; Núñez-Gastélum *et al.*, 2011). Estes processos são realizados antes da extracção com solventes, e permitem estabilizar e aumentar a recuperação de carotenóides em subprodutos de crustáceos.

É de notar, que alguns investigadores recomendam o uso de antioxidantes, como por exemplo o BHT (hidroxitolueno butilado) e o ácido ascórbico, no solvente de extracção de forma a proteger a astaxantina da degradação (Meyers & Chen, 1982b; Armenta-López *et al.*, 2002b; Quirós & Costa, 2006).

## 1.5.1 Processos de pré-tratamento da amostra

### 1.5.1.1 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática tem sido documentada como um método viável como pré-tratamento para recuperação da astaxantina. Como já foi referido anteriormente, as carotenoproteínas são complexos estáveis presentes, normalmente, em maior quantidade no exoesqueleto de crustáceos. A clivagem deste complexo, através da hidrólise enzimática, resulta numa maior intensidade da cor devido à libertação da astaxantina, aumentando também a sensibilidade de detecção (Shahidi & Brown, 1998).

Vários factores influenciam a actividade enzimática, tais como, a concentração de substrato, pH, temperatura e a duração da hidrólise. Sendo que os mesmos têm de ser optimizados.

Meyers & Chen (1982b) realizaram a hidrólise enzimática em subprodutos de lagostim (*P. clarkii*) testando cinco enzimas. O uso da protease comercial Mylezyme<sup>®</sup> incrementou em 58% a libertação da astaxantina. Cremades *et al.*, (2003) também aplicaram a hidrólise enzimática, em subprodutos de lagostim *P. clarkii*, obtendo 610 µg/g de carotenóides totais em amostras hidrolisadas e 198 µg/g em amostras não hidrolisadas.

Contudo, é importante referir que a aplicação da hidrólise enzimática numa base comercial deve ser avaliada em termos de custo, pois as enzimas são dispendiosas e há aumento do tempo do processo (Armenta-López *et al.*, 2002a)

### 1.5.1.2 Tratamento térmico

O processo de cozedura/tratamento térmico da amostra leva à desnaturação irreversível das proteínas e consequente libertação da astaxantina, originando uma coloração laranja-avermelhada mais intensa (Rodriguez-Amaya, 1999).

Segundo Meyers & Chen (1982b), a quantidade de astaxantina no exoesqueleto de lagostim *P. clarkii* cozido (161,5 µg/g) foi quase duas vezes superior em relação à amostra crua (87,8 µg/g).

Perdigão *et al.* (1995) investigaram o efeito do tratamento térmico na extracção de carotenóides em exoesqueleto de lagostas, camarão e caranguejo. As amostras, com e sem tratamento térmico prévio por imersão de água fervente, foram secas a 60 °C, durante 5 horas e trituradas. Na extracção foi utilizado óleo de soja numa proporção de 1:1 (m/v) em banho-maria a 80 °C durante 30 minutos. As amostras com tratamento térmico

apresentaram maior teor de carotenóides, o que significa que este pré-tratamento pode provocar uma quebra de ligação do complexo carotenoproteína, facilitando assim a extracção (Perdigão *et al.*, 1995).

Sanches-Silva *et al.* (2012b) também compararam a quantidade de astaxantina em amostras de camarão cozidas e cruas. As amostras foram trituradas e a extracção foi realizada com metanol. Seguidamente, a mistura foi submetida ao vórtex e sonificada. Os resultados evidenciaram que o camarão cozido apresentava, aproximadamente, 1,6 vezes mais astaxantina do que o camarão cru.

### **1.5.1.3 Tamanho das partículas da amostra**

O tamanho das partículas da amostra, após o processo de trituração, também tem influência na extracção de astaxantina em subprodutos de crustáceos, logo existe necessidade de otimizar este parâmetro de forma a obter um maior rendimento de extracção. Estudos têm evidenciado que a redução do tamanho das partículas tem um efeito positivo na extracção dos pigmentos com solventes orgânicos devido ao aumento da área de superfície e da transferência de massa (Meyers & Chen, 1982b; Meyers & Chen, 1983; Perdigão *et al.*, 1995; Luna-Rodríguez *et al.*, 2008).

Por exemplo, a redução do tamanho das partículas da amostra de 5 mm para 2 mm de diâmetro, resultou num aumento de 40% na quantidade de astaxantina recuperada (Meyers & Chen, 1982b).

### **1.5.1.4 Saponificação**

Alguns estudos usaram o processo de saponificação de forma a purificar o extracto, ou seja, separar substâncias como os lípidos que podem interferir com a detecção cromatográfica (Quirós & Costa, 2006). Este processo permite hidrolisar as ligações éster da astaxantina com ácidos gordos, através da adição de uma base forte, por exemplo o hidróxido de potássio (KOH), e na presença de um álcool de cadeia curta, sob efeito de aquecimento (Vilaso-Martínez *et al.*, 2008; Herrera-Andrade *et al.*, 2011; Núñez-Gastélum *et al.*, 2011).

A saponificação pode aumentar a concentração de alguns carotenoides e reduzir outros (Sanches-Silva *et al.*, 2013). Contudo, no caso particular das xantofilas, estas são mais sensíveis aos tratamentos alcalinos (Quirós & Costa, 2006).

Segundo Herrera-Andrade *et al.* (2011), o teor de astaxantina na amostra de camarão saponificada reduziu em 50,9%, comparativamente com a amostra não saponificada. Uma das razões associadas a esta redução é a alteração irreversível da astaxantina em astaceno. Noutro estudo, observou-se que a saponificação de uma amostra de caranguejo *Chionoecetes opilio*, não permitiu a extracção da astaxantina e dos seus derivados (Vilaso-Martínez *et al.*, 2008). López-Cervantes *et al.* (2006a) afirma que a astaxantina é um carotenóide alcalino-lábil, assim sendo, a saponificação deve ser descartada.

### 1.5.1.5 Silagem química

A silagem química consiste na adição de ácidos orgânicos e/ou minerais (principalmente fórmico, acético, propiónico, clorídrico, sulfúrico) em material biológico, como os subprodutos de crustáceos. Essa adição provoca uma diminuição rápida do pH do substrato evitando o crescimento de microorganismos indesejáveis e proporcionar uma maior conservação a baixo custo (Meyers *et al.*, 1990; Sachindra *et al.*, 2007).

O pH é dos parâmetros de qualidade com maior importância no desenvolvimento do processo, indicando qualquer alteração que pode afectar o produto. Outros parâmetros de qualidade, também importantes, são o teor de humidade, cinzas, proteínas e lípidos. A silagem química estimula a actividade enzimática proteolítica, de origem endógena dos crustáceos (Meyers & Chen, 1983; Meyers *et al.*, 1990).

Meyers & Chen (1983) realizaram a silagem química em subprodutos de lagostim *P. clarkii*, através da adição de uma mistura de ácidos orgânicos/inorgânicos e incubação a uma temperatura de 40 °C durante 1-2 horas de forma a avaliar a evolução da hidrólise. A concentração de astaxantina nos subprodutos ensilados foi superior a um pH baixo (4,0), provavelmente devido à acção do ácido sobre as ligações químicas da astaxantina com os componentes ou proteínas constituintes.

Meyers & Chen (1983) também testaram o efeito da silagem ácida na descalcificação do exoesqueleto, sendo que, cerca de 70% do carbonato de cálcio foi solubilizado quando o pH foi reduzido de 8,3 para 4,0. Existe uma correlação entre a percentagem de carbonato de cálcio solubilizado e a concentração de astaxantina extraída a pH baixo (4,0). Os autores sugerem que a astaxantina pode estar ligada quimicamente ao carbonato de cálcio do exoesqueleto, e com a solubilização deste mineral a pH baixo a astaxantina torna-se mais disponível para a extracção.

A um pH baixo, a astaxantina é mais estável devido ao facto de promover um ambiente redutor aumentando a estabilidade dos carotenóides (Torrissen *et al.*, 1981; Guillou *et al.*, 1995; Armenta-López *et al.*, 2002b).

As desvantagens associadas ao uso da silagem ácida são:

- 1) os ácidos são corrosivos e podem originar subprodutos altamente contaminantes, apesar das concentrações usadas serem baixas;
- 2) o pH do produto final necessita de ser neutralizado (Zavaleta, 2010).

#### **1.5.1.6 Silagem bacteriana (Fermentação)**

A fermentação é um processo que permite aumentar a estabilidade dos subprodutos de crustáceos, durante um longo prazo de armazenamento, e facilita a recuperação e separação de produtos de valor comercial, tais como, a astaxantina, quitina, proteínas, lípidos e minerais (Armenta-López *et al.*, 2002a; Cremades *et al.*, 2003; López-Cervantes *et al.*, 2006a; López-Cervantes *et al.*, 2010; Núñez-Gastélum *et al.*, 2011).

A silagem bacteriana inclui vários tipos de fermentação, tais como, a fermentação acética, láctica e propiónica. Este processo consiste na inoculação de bactérias seleccionadas em subprodutos de crustáceos e na produção de um ácido *in situ* a partir de uma fonte de hidratos de carbono. Como resultado da produção do ácido e conseqüente redução de pH, ocorre a inibição do crescimento de microorganismos (Arbia *et al.*, 2012).

As condições ideais deste processo dependem de vários factores que necessitam de ser optimizados: escolha e a concentração dos hidratos de carbono, pH, temperatura, tempo e condições aeróbias ou anaeróbias (López-Cervantes *et al.*, 2006a; López-Cervantes *et al.*, 2010, Zavaleta, 2010).

Segundo López-Cervantes *et al.* (2010), após a activação do inóculo comercial (*Lactobacillus sp.*), os subprodutos de camarão foram fermentados com 6,6% de cana-de-açúcar (m/m) e 50% de *Lactobacillus sp.* (v/m) a 36 °C durante 24 horas. O fermentado foi centrifugado a 5 °C e obtiveram-se três fracções distintas: fracção sólida rica em quitina; fracção lipídica rica em astaxantina, ácidos gordos e vitaminas; fracção líquida hidrolisada com aminoácidos e minerais. A fase superior (pasta lipídica) é separada manualmente e as outras fracções por decantação. Os resultados evidenciaram que o líquido hidrolisado é a fracção mais abundante (55%), seguido a quitina (29%) e a fracção lipídica (5%). O teor de

cinzas na fracção lipídica (rica em astaxantina) foi reduzido, o que indica que a fermentação é eficiente na remoção do carbonato de cálcio no exoesqueleto (desmineralização).

Segundo López-Cervantes *et al.* (2010), a presença de aminoácidos nas diferentes fracções do fermentado pode ser atribuída ao processo fermentativo, com dois efeitos simultâneos, a desproteínização (quebra da ligação do complexo quitina-proteína) e a desmineralização. Este processo ocorre principalmente devido à acção das enzimas proteolíticas produzidas pela bactéria *Lactobacillus* adicionada, pelas bactérias intestinais do camarão, ou proteases presentes nos resíduos biológicos (Arbia *et al.*, 2012). Desta forma, é produzida quitina parcialmente purificada e a libertação de aminoácidos das várias fracções (como da fracção lipídica rica em astaxantina).

Armenta-López *et al.* (2002a) usaram a técnica de HPLC para determinar a concentração de astaxantina em subprodutos de camarão fermentados e não fermentados, e os valores mais elevados foram obtidos em amostras fermentadas (1,25 µg/g) relativamente às amostras não fermentadas (0,96 µg/g). A explicação dos autores relativamente a estas diferenças deve-se ao facto, da fermentação láctica conferir uma maior estabilidade à astaxantina, visto que este processo promove um ambiente redutor. Além disso, durante a fermentação ocorre a quebra da ligação da astaxantina com proteínas e a quitina, tornando a astaxantina mais disponível para extracção.

De um modo geral, as vantagens da fermentação são as seguintes:

- 1) mais económico que a silagem ácida;
- 2) são produzidos alguns agentes inibidores, como as bacteriocinas;
- 3) o produto final não necessita de neutralização;
- 4) o valor nutricional do produto obtido na fermentação é maior do que na silagem química (Silva *et al.*, 1994).

### **1.5.2 Extracção com solventes orgânicos**

Os carotenóides são compostos de baixa polaridade (lipofílicos) (Quirós & Costa, 2006). Entretanto, essas moléculas orgânicas possuem uma parte polar solúvel em solventes polares e uma parte apolar, aumentando assim o espectro de solventes orgânicos com utilidade na extracção destes (Markom *et al.*, 2007).

López- Cervantes *et al.* (2006a) testaram cinco solventes orgânicos (metanol, hexano, etanol, acetoneitrilo, metil-etil-cetona) para avaliar o rendimento de extracção da astaxantina

na fracção lipídica, obtida através da fermentação de camarão. O metanol e o hexano foram os solventes que evidenciaram melhores resultados de extracção. Com base neste estudo, vários investigadores adoptaram o metanol como solvente de extracção nos seus métodos (Herrera-Andrade *et al.*, 2011; Núñez-Gastélum *et al.*, 2011; Sanches-Silva *et al.*, 2012b). É importante referir também que o metanol é um solvente onde ocorre baixa isomerização de *trans*-astaxantina para *cis*-astaxantina (Yuan *et al.*, 1999). Desta forma, tendo em conta as vantagens, o metanol foi o solvente de extracção escolhido no presente trabalho.

Britton (1985) refere que o uso de solventes polares como a acetona, metanol ou etanol são eficientes na extracção de carotenóides a partir de matrizes contendo água. Delgado-Vargas *et al.*, (2003) referem que os solventes polares são, geralmente, bons meios de extracção para xantofilas, mas para carotenos os solventes apolares são mais eficientes. No entanto, no caso de matrizes com água, o uso de solventes apolares não é recomendado, pois a penetração desses na parte hidrofóbica dos pigmentos é limitada.

Meyers & Bligh (1981) utilizaram uma mistura de solventes polares e apolares, éter de petróleo: acetona: água (15:75:10 v/ v/v/) para a extracção de carotenóides de subprodutos de lagostins (*P. clarkii*), obtendo uma elevada concentração de astaxantina total (153 µg/g).

É de notar que, a recuperação do solvente é uma etapa crucial no processo de extracção com solventes orgânicos devido principalmente aos factores de segurança operacional, ambientais e económicos. Por outro lado, as temperaturas altas requeridas para a remoção dos solventes podem resultar na degradação desses pigmentos, além de ser um processo lento e o produto final poder conter quantidades residuais de solvente e, conseqüentemente reduzir o seu potencial de utilização em produtos alimentícios (Reverchon *et al.*, 2006; Babu *et al.*, 2008).

### **1.5.3 Extracção com óleos de origem vegetal**

A extracção de astaxantina usando óleos vegetais contribui para a estabilidade da astaxantina devido ao facto de oferecer uma barreira protectora ao oxigénio, retardando os processos de oxidação. O óleo de extracção serve como um bom transportador de carotenóides, assim como uma fonte lipídica e energética em aplicações como os suplementos alimentares e em dietas de salmonídeos (Meyers & Chen, 1982b; Shahidi & Synowiecki, 1991; Luna-Rodriguez *et al.*, 2008; Pu *et al.*, 2010b).

Meyers & Chen (1982a) utilizaram o método de extracção com óleo de soja, em subprodutos de lagostim *P. clarkii*. O uso de óleo de soja teve amplas vantagens relativamente ao uso de solventes orgânicos. Para aplicação na alimentação de salmonídeos, uma das vantagens é o facto de não se proceder à eliminação do solvente quando se usa um óleo vegetal, sendo o produto obtido uma mistura de óleo/extracto rico em astaxantina. Além disso, o processo não apresenta inconvenientes de degradação térmica da astaxantina comparativamente com o uso de solventes orgânicos. A extracção máxima de astaxantina (600 µg/g de óleo) foi obtida pela proporção de 1:10 (amostra/óleo) a uma temperatura de 80-90°C durante 30 minutos.

Por outro lado, Sachindra & Mahendrakar (2005b) determinaram o rendimento de extracção da astaxantina em subprodutos de camarão (*Penaeus indicus*) testando diferentes óleos vegetais (girassol, gengibre, soja, coco e farelo de arroz). O melhor rendimento de extracção foi obtido com o óleo de girassol (26,3 µg/g amostra), a uma temperatura de 70 °C durante 150 minutos e com a proporção de óleo/resíduo de 2:1 (volume/massa). Para extracção em larga escala, o óleo pigmentado pode ser seco, usando um agente de secagem, de formar a melhorar a estabilidade durante o armazenamento.

#### **1.5.4 Processo de extracção por ultra-sons**

O banho de ultra-sons pode ser usado como uma técnica alternativa para extracção de compostos, visto que o colapso das microbolhas favorece a extracção de compostos químicos a partir de materiais sólidos, bem como a dissolução destes (Korn *et al.*, 2005).

O processo de ultra-sons utiliza a energia das ondas mecânicas, que se propagam através de qualquer meio material, com frequência superior à da capacidade auditiva humana (acima de 20 kHz). Num líquido, estas ondas criam um ciclo de expansão, podendo gerar bolhas ou cavitação. Os colapsos das bolhas de cavitação provocam a liberação de grande quantidade de energia para o meio (Korn *et al.*, 2005).

Desta forma, os principais efeitos do sistema de ultra-sons na extracção são o aumento da permeabilidade das paredes celulares. Este processo facilita a dilatação e a hidratação da amostra, aumentando o tamanho dos poros da parede celular e optimizando os processos de difusão e de transferência de massa. Este processo pode provocar o rompimento da parede celular, o que causa a saída de compostos celulares, além de aumentar a eficiência da extracção e/ou redução do tempo de extracção. O uso de

processos de ultra-sons é promissor visto que não utiliza temperaturas de aquecimento, não causando danos em compostos termolábeis (Mezzomo, 2012).

Alguns autores têm optado pelo banho de ultra-sons para extrair com mais eficácia a astaxantina em crustáceos (Meyers & Chen, 1982b; López-Cervantes *et al.*, 2006a; Núñez-Gastélum *et al.*, 2011; Sanches-Silva *et al.*, 2012b).

## **1.6 Métodos analíticos de quantificação da astaxantina**

A astaxantina tem sido determinada em inúmeras matrizes, tal como em salmonídeos (Sheehan *et al.*, 1998), em microalgas (Yuan *et al.*, 1997), leveduras (Lim *et al.*, 2002), caranguejo (Vilasoá-Martínez *et al.*, 2008), lagostim (Pu, 2010a) e camarão (Sachindra *et al.*, 2005a; Sanches-Silva *et al.*, 2012b).

Os carotenóides, como a astaxantina, podem absorver luz especificamente na região do ultravioleta e visível do espectro, sendo o restante transmitido ou reflectido, gerando as cores características. A estrutura responsável pela absorção da luz é o grupo cromóforo, que nos carotenóides se caracteriza pelas ligações duplas conjugadas, onde cada cromóforo é caracterizado por um espectro de absorção (Gross, 1991).

Geralmente, a astaxantina é determinada por espectrofotometria de UV-Vis (Meyers & Bligh, 1981; Guillou *et al.*, 1995; Nuñez-Gastélum *et al.*, 2011) ou por cromatografia (López-Cervantes *et al.*, 2006a).

O método clássico de quantificação de carotenóides por espectrofotometria na região do UV-visível ainda tem sido empregado em diversas matrizes, principalmente naquelas que são ricas num carotenóide específico, onde se utiliza o comprimento de onda de absorção máximo do carotenóide maioritário e o seu correspondente coeficiente extinção molar (Xavier *et al.*, 2010). No caso da determinação da astaxantina no lagostim *P. clarkii*, os estudos conhecidos apenas têm aplicado a técnica clássica por espectrofotometria de UV-Vis (Meyers & Bligh, 1981; Meyers & Chen, 1983; Pérez-Gálvez *et al.*, 2008; Pu, 2010a; Cremades *et al.*, 2001).

Actualmente, a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) tem sido amplamente aplicada no estudo e na análise de carotenóides como a astaxantina, e tem várias vantagens em relação aos métodos tradicionais, tais como rapidez de análise, alta resolução, boa reprodutibilidade e pouca modificação estrutural dos carotenóides (Delgado-Vargas *et al.*, 1993; Quirós & Costa, 2006).

A determinação da astaxantina por HPLC é usada, na sua maioria, com detectores de ultravioleta-visível (UV-Vis) (Sheehan *et al.*, 1998; Sachindra *et al.*, 2005a) ou de fotodiodos (DAD) (Vilasoá-Martínez *et al.*, 2008). O detector mais sofisticado, da zona do UV-Vis, aplicado na separação de compostos com espectros de absorção característicos, tais como os carotenóides, é o detector de fotodiodos (DAD) (Oliver & Palou, 2000).

Este sistema de detecção permite a detecção a vários comprimentos de onda, e quando é requerida alta sensibilidade este método é uma boa alternativa (Quirós & Costa, 2006). O detector de fotodiodos (DAD) é capaz de gravar todo o intervalo espectral (de 190 a 800 nm) durante as análises. Assim, qualquer cromatograma, no comprimento de onda seleccionado, pode ser monitorizado e o espectro de absorção do pico cromatográfico, pode ser gravados durante a separação cromatográfica (Oliver & Palou, 2000). Os autores Oliver & Palou (2000) referem que este detector facilita a identificação de carotenóides sob a forma esterificada, como o caso da astaxantina. Além disso, este detector também fornece informações sobre a pureza dos compostos (Delgado-Vargas *et al.*, 2003).

Os detectores de ultravioleta-visível (UV-Vis) são menos sensíveis, pois o comprimento de onda seleccionado para a análise pode não ser o mais adequado para todos os componentes da amostra, logo resulta numa perda de sensibilidade (Oliver & Palou, 2000). Desta forma, as propriedades do detector de fotodiodos (DAD) fazem com que seja um método adequado na identificação de carotenóides resultantes da separação cromatográfica. Actualmente, este método é usado mais frequentemente em publicações sobre a determinação de carotenóides, como o caso da astaxantina (López-Cervantes *et al.*, 2006a; Gimeno *et al.*, 2007; Vilasoá-Martínez *et al.*, 2008; Sanches-Silva *et al.*, 2012b). Por estas razões, no presente trabalho optou-se por usar o detector de fotodiodos (DAD), como veremos mais à frente.

No caso de matrizes complexas, quando a técnica HPLC acoplada ao detector de fotodiodos (DAD) não é suficiente para alcançar uma identificação inequívoca dos compostos, o acoplamento desta à espectrometria de massas (MS) usualmente apresenta óptimos resultados (Quirós & Costa, 2006). Tem sido reportado em vários estudos que a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS) é uma ferramenta inovadora e eficaz na identificação de carotenóides, uma vez que fornece informações sobre a estrutura, e além disso, é uma técnica muito sensível (Lacker *et al.*, 1999; Quirós & Costa, 2006).

Os métodos HPLC-MS desenvolvidos para a análise de carotenóides, como a astaxantina, incluem a ionização química a pressão atmosférica (APCI) (Lacker *et al.*, 1999) ou ionização por *electrospray* (ESI) (Careri *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2005). Vários autores têm usado a técnica de HPLC-MS para confirmar a identificação correcta de picos de compostos e a pureza em amostras complexas (Quirós & Costa, 2006), como é o caso de Vilasoa-Martínez *et al.* (2008) para a determinação da astaxantina,  $\beta$ -caroteno e a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) no caranguejo *Chionoecetes opilio*.

A separação cromatográfica da astaxantina por HPLC tem sido realizada utilizando-se colunas de fase reversa (Sheehan *et al.*, 1998; López-Cervantes *et al.*, 2006a; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008; Sanches-Silva *et al.*, 2012b) ou de fase normal (Coral-Hinostroza & Bjerkgeng, 2002; Rao *et al.*, 2005).

A fase reversa caracteriza-se por uma fase estacionária apolar e a fase móvel ligeiramente polar sendo que, actualmente é o método mais utilizado. A fase reversa baseia-se no princípio de interacções hidrofóbicas que resultam em forças repulsivas entre um eluente polar, uma molécula pouco polar e a fase estacionária apolar. A parte da molécula não polar fica ligada à fase estacionária. Quanto mais apolar for o solvente, mais forças vão criar com a molécula pouco polar e menor será o seu tempo de retenção (Kazakevich & LoBrutto, 2007).

A eluição utilizada tanto é isocrática (Careri *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2002; López-Cervantes *et al.*, 2006a) como por gradiente (Yuan & Chen, 1997; Sachindra *et al.*, 2005a; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008). Geralmente, os métodos que utilizam a eluição por gradiente alcançam uma melhor resolução, comparado com a eluição isocrática, no entanto, apresentam alguns inconvenientes, como por exemplo, um maior tempo de análise devido à necessidade de reequilibrar a coluna após cada injeção. O sistema de gradiente é utilizado especialmente em extractos complexos contendo carotenóides com diferentes polaridades (Quirós & Costa, 2006).

A técnica de HPLC em fase reversa é amplamente usada para separar carotenóides, sendo as colunas  $C_8$  e principalmente as colunas  $C_{18}$ , muitas vezes seleccionadas pelos investigadores para determinar a astaxantina (Yuan & Chen, 1997; Sheehan *et al.*, 1998; Careri *et al.*, 1999; Li & Chen, 2001; Coral-Hinostroza & Bjerkgeng, 2002; Sachindra *et al.*, 2005a; López-Cervantes *et al.*, 2006a; Quirós & Costa, 2006; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008).

A maioria dos métodos para a determinação da astaxantina usa colunas com partícula de tamanho de 5  $\mu\text{m}$  (Yuan & Chen, 1997; Refsgaard *et al.*, 1998; Careri *et al.*, 1999; Coral-Hinostroza & Bjerkgeng, 2002; López-Cervantes *et al.*, 2006a; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008), alguns com partículas de 4  $\mu\text{m}$  (Li *et al.*, 2005) e 3  $\mu\text{m}$  (Lacker *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2002).

Actualmente, Sanches-Silva *et al.* (2012b) para a determinação da astaxantina em camarão usaram uma coluna analítica UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> com partículas de tamanho de 1,7  $\mu\text{m}$ , permitindo uma excelente resolução dos picos. Os autores explicam que o uso deste tipo de colunas com partículas de menor tamanho (<2  $\mu\text{m}$ ) permite trabalhar a altas pressões (> 400 bar), melhorando parâmetros como a sensibilidade, resolução e tempos de retenção. Desta forma, tendo em conta as vantagens de análise, no presente trabalho foi aplicada esta metodologia.

Outro factor importante a ter em conta para alcançar uma separação satisfatória dos carotenóides é a temperatura da coluna, visto que mudanças de temperatura causam alterações significativas na resposta cromatográfica dos carotenóides, pelo que é importante trabalhar a uma temperatura constante (Huck *et al.*, 2000; Quirós & Costa, 2006). Em publicações onde é determinada a astaxantina têm sido aplicadas temperaturas de 20 °C (Sanches-Silva *et al.*, 2012b), 25 °C (Yuan & Chen, 1997; López-Cervantes *et al.*, 2006) e 30 °C (Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008).

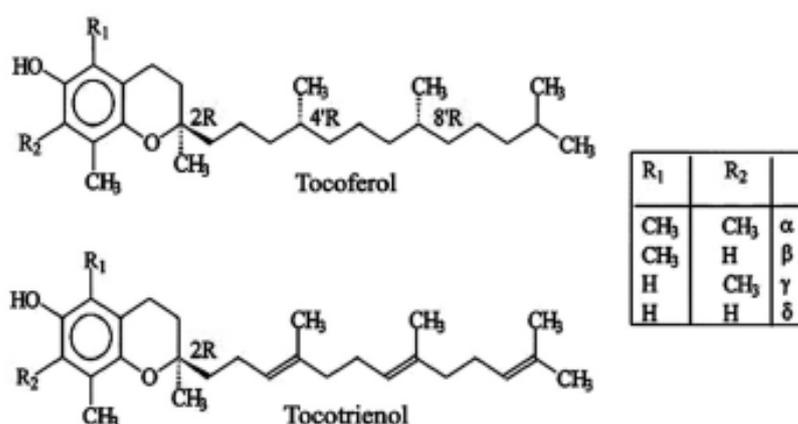
## 1.7 A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) nos crustáceos

A vitamina E (tocoferóis) é considerada um elemento nutricional essencial para os crustáceos, nomeadamente ao nível do desenvolvimento, crescimento e reprodução (Barim, 2005; Barim, 2009). Estudos têm evidenciado que o  $\alpha$ -tocoferol, uma das formas mais activas da vitamina E, é a forma predominante em tecidos de crustáceos e peixes (Refsgaard *et al.*, 1998; Palace & Werner, 2006; Barim *et al.*, 2011; Hamdi, 2011). Esta vitamina lipossolúvel não pode ser sintetizada pelos crustáceos e peixes, logo é obtida através da alimentação como plantas e animais (Palace & Werner, 2006; Barim *et al.*, 2011).

O termo genérico Vitamina E é usado para designar uma família de compostos quimicamente relacionados, denominado por tocoferóis e tocotrienóis, os quais partilham uma estrutura comum com um anel cromanol e uma cadeia lateral de unidades isopreno (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). A cadeia lateral está inserida na membrana lipídica das membranas celulares e subcelulares, enquanto o anel cromanol projecta-se para o interior

ou exterior da superfície da membrana. O grupo hidroxilo (OH) situado no anel cromanol, tanto nos tocoferóis como nos tocotrienóis, é um centro da actividade antioxidante da vitamina (Ferreira, 1985; Palace & Werner, 2006).

Esta vitamina é constituída por oito compostos químicos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  tocoferóis e quatro tocotrienóis correspondentes (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Estes isómeros, tanto tocoferóis como tocotrienóis diferem na estrutura de acordo com a localização dos grupos substituintes no anel cromanol (Guinaz *et al.*, 2009). Enquanto, os tocotrienóis diferem dos tocoferóis por terem uma cadeia lateral insaturada (com ligações duplas) (Palace & Werner, 2006). A estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis é apresentada na Figura 6.



**Figura 6** Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis (Guinaz *et al.*, 2009).

Os tocoferóis têm sido reconhecidos como um dos mais importantes antioxidantes naturais, visto que são dotados de propriedades redutoras. Devido ao seu papel como captador de radicais livres, a vitamina E também intervém na protecção do nosso corpo contra anomalias degenerativas, principalmente, cancro e doenças cardiovasculares (Heinonen *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2002). Eles inibem a produção de radicais peróxido lipídicos induzida pelas espécies reactivas de oxigénio (ROS), protegendo assim as células da peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) na membrana fosfolipídica de danos oxidativos das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), proteínas celulares e DNA, e da degeneração da membrana (Fang *et al.*, 2002).

É de notar que, os diferentes isómeros da vitamina E têm diferentes potenciais *in vivo*. O potencial biológico, ao nível da absorção intestinal dos tocoferóis, é da seguinte ordem  $\alpha$ -tocoferol >  $\beta$ -tocoferol >  $\gamma$ -tocoferol >  $\delta$ -tocoferol. O  $\alpha$ -tocotrienol tem apenas 25% do

potencial biológico, ao nível da absorção intestinal, do  $\alpha$ -tocoferol (Deshpande *et al.*, 1996). Desta forma, o  $\alpha$ -tocoferol foi considerado a forma mais activa da vitamina E em humanos, tendo sido demonstrado que apresenta uma grande actividade biológica (Fang *et al.*, 2002).

A determinação de vitaminas em matrizes alimentares, nomeadamente em subprodutos, é essencial em investigação na área da nutrição, de forma a encontrar possíveis aplicações na indústria alimentar. Alguns investigadores quantificaram o  $\alpha$ -tocoferol em diversos crustáceos, tais como, em subprodutos de camarão *Penaeus sp.* (López-Cervantes *et al.*, 2006b), lagostim *P. clarkii* (Hamdi, 2011) e no caranguejo *Chionoecetes opilio* (Vilaso-Martínez *et al.*, 2008).

Hamdi (2011) quantificou várias vitaminas no lagostim *P. clarkii* por HPLC, sendo que a vitamina E encontrou-se em maiores concentrações, tanto no exoesqueleto (310  $\mu\text{g/g}$ ) como na parte edível (413  $\mu\text{g/g}$ ). Também Vilaso-Martínez *et al.* (2008) usou a técnica de HPLC-FLD (detector de fluorescência) para quantificar o  $\alpha$ -tocoferol no caranguejo *Chionoecetes opilio*, obtendo um valor de 233  $\mu\text{g/g}$  em matéria seca.

Também, López-Cervantes *et al.* (2006b) determinou pela técnica de HPLC-DAD o  $\alpha$ -tocoferol na fracção lipídica de camarão fermentado (cefalotórax e exoesqueleto), obtendo um valor de 351  $\mu\text{g/g}$  em matéria seca. O autor salienta que a fracção lipídica dos subprodutos de camarão fermentado é rica em compostos valiosos como os pigmentos carotenóides (principalmente a astaxantina), esteróis (colesterol) e vitaminas A (retinol) e E ( $\alpha$ -tocoferol), que podem ser aplicados como suplementos nutricionais na indústria de aquacultura de peixes e crustáceos.

No caso particular do  $\alpha$ -tocoferol, é relatado como uma vitamina com funções biológicas importantes na saúde, crescimento, desenvolvimento e reprodução de peixes. Desta forma, a suplementação com  $\alpha$ -tocoferol torna-se essencial em produções de aquacultura (Palace & Werner, 2006; Barim *et al.*, 2011).

A caracterização e quantificação da vitamina E implicam, à semelhança do que acontece na análise de outras substâncias, uma prévia separação e purificação das substâncias da matriz. Os processos de preparação da amostra estão estritamente relacionados com a natureza da matriz e com a metodologia analítica a usar (Cunha, 2007).

Por exemplo nos óleos e azeites o processo de extracção é relativamente simples, implicando apenas uma solubilização com solventes orgânicos (Cunha, 2007), como é o caso do método usado por Seppanen *et al.* (2003) que determinaram simultaneamente tocoferóis,

tocotrienóis e o  $\beta$ -caroteno em óleo de soja e azeite. Contrariamente, noutras matrizes lipídicas é necessário isolar a matéria lipídica; segue-se um processo de hidrólise (saponificação) para isolar a fracção insaponificável, na qual se encontra a vitamina E (Cunha, 2007).

Nos estudos em crustáceos e em algas tem sido aplicada a saponificação para isolar a vitamina E, sendo habitualmente a fracção insaponificável isolada com hexano (Sánchez-Machado *et al.*, 2002; López-Cervantes *et al.*, 2006b; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008).

A técnica de HPLC permite em geral uma rápida, simples, sensível, selectiva e robusta separação dos tocoferóis. As características químicas destes compostos permitem que a sua separação possa ser realizada por HPLC, quer em colunas de fase normal quer em colunas de fase reversa (Cunha, 2007)

Vários detectores são passíveis de serem utilizados na separação por cromatografia líquida, para a monitorização da vitamina E, nomeadamente o detector UV-Vis, o de fluorescência (FLD), o de diodos (DAD) e o de massa (MS) (Cunha, 2007). No caso específico do  $\alpha$ -tocoferol o detector de fluorescência (FLD) tem sido amplamente usado (Refsgaard *et al.*, 1998; Sánchez-Machado *et al.*, 2002; Seppanen *et al.* 2006; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008).

Segundo alguns autores, apesar do  $\alpha$ -tocoferol ser detectado pelo detector UV-Vis, o detector de fluorescência tem sido seleccionado por apresentar alta selectividade e sensibilidade (Sánchez-Machado *et al.*, 2002; Vilasoa-Martínez *et al.*, 2008).

Sánchez-Machado *et al.* (2002) usaram o detector (UV-Vis) e o de fluorescência na determinação do  $\alpha$ -tocoferol, sendo que o de fluorescência evidenciou maior sensibilidade (limite de detecção de 10,4 ng/mL contra 104 ng/mL, com detecção UV-Vis), bem como uma boa precisão e recuperação. Contudo, é de notar que também existem autores que aplicam o detector de diodos (DAD) (López-Cervantes *et al.*, 2006b; Sanches-Silva *et al.*, 2010b).

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Determinação da Humidade

Para a determinação da humidade, foi usado o método de secagem em estufa de acordo com as Normas Portuguesas NP 1088:1982 e NP 1614:2002. Este método baseia-se na evaporação da água existente na amostra por secagem em estufa até à obtenção de um peso constante.

Os materiais usados nesta análise foram uma estufa da marca Selecta (Barcelona, Espanha), exsicador com sílica, banho de água fervente, Grindomix GM200, Retsch (Haan, Germany) e uma balança analítica Mettler Toledo® (Modelo A-G285) com uma exactidão de 0,0001g.

A humidade foi determinada nas três partes do lagostim cru, nomeadamente, o cefalotórax, o exoesqueleto e a parte edível. Cada parte foi triturada individualmente em triturador Grindomix a 10000 rpm durante aproximadamente 2 minutos.

O procedimento experimental foi realizado do seguinte forma:

- Colocou-se a cápsula de porcelana, em estufa a  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 1 hora.

Nota: No caso de produtos que necessitam de dispersão, ou seja, produtos com elevado teor de água como a parte edível do lagostim, para uma melhor homogeneização, a cápsula deve conter areia e uma vareta de vidro. No caso do exoesqueleto e do cefalotórax, a adição de areia não foi necessária;

- Retirou-se a cápsula da estufa, deixou-se arrefecer em exsicador até atingir a temperatura ambiente e pesou-se em balança analítica;
- Pesou-se para dentro da cápsula  $5 \pm 0,4$  g de amostra. No caso da parte edível (amostra), homogeneizou-se bem o produto com a areia, com o auxílio de uma vareta de vidro e seguidamente adicionou-se água para uma melhor homogeneização do produto. Posteriormente, o conjunto (cápsula + areia + vareta + amostra) foi submetido a um banho-maria ( $T = 95 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) para evaporar a maior parte da água antes da secagem em estufa;
- Colocou-se a cápsula com a amostra na estufa a  $102^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas. Retirou-se da estufa, deixou-se arrefecer em exsicador até atingir a temperatura ambiente, e pesou-se em balança analítica;

- Repetiu-se o procedimento de secagem (com períodos de 1 hora), arrefecimento e pesagem até à obtenção de peso constante, ou seja, até uma variação de peso  $\leq 0,0010\text{g}$ . O teor de água/humidade (H), é calculado pela equação 3 do Anexo I.

## 2.2 Determinação da actividade antioxidante

### 2.2.1 Amostras biológicas em estudo

Para a determinação da actividade antioxidante as amostras de lagostim *Procambarus clarkii* foram capturadas no mês de Junho (Primavera/Verão). Os indivíduos usados eram todos adultos, onde os pesos variaram de 18,21 a 20,18 gramas. As amostras de camarão selvagem e de aquacultura *Penaeus sp.* foram obtidas num estabelecimento comercial em Coimbra.

### 2.2.2 Reagentes e Padrões

Nos ensaios da actividade antioxidante, o radical DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), o ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)] e o Trolox (ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O Persulfato de Potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). O metanol, de grau analítico HPLC, usado na actividade antioxidante foi adquirido pela Sigma-Aldrich.

### 2.2.3 Material Laboratorial

A determinação da actividade antioxidante foi realizada no laboratório de Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Onde foram utilizadas pipetas graduadas, balões volumétricos, provetas, funis de vidro, tubos de ensaio, uma micropipeta de 100  $\mu\text{L}$  (Pipetman P100, Molsheim, França), balões para evaporador rotativo com capacidade de 500 mL, filtros de papel Whatman n<sup>o</sup>1, filtros para seringa (poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) da Millipore (Billerica, EUA).

Também foi usado um liofilizador FreeZone<sup>®</sup> Stoppering Tray Dryer (Modelo 794880), um agitador mecânico da IKA<sup>®</sup>-Labortechnik (Staufen, Alemanha), evaporador rotativo da Büchi Re111 (Switzerland, Suíça), uma balança analítica Mettler Toledo<sup>®</sup> (Modelo A-G285) e um espectrofotómetro Hitachi U-3900 (Tokio, Japão).

#### **2.2.4 Determinação da actividade antioxidante *in vitro* dos extractos de lagostim *P. clarkii* e camarão selvagem e de aquacultura (*Penaeus sp.*)**

Para a determinação da actividade antioxidante foi usada a técnica de espectrofotometria na região do UV-Vis através do espectrofotómetro Hitachi U-3900. Os espectros de absorção foram determinados nos comprimentos de onda de 517 nm (método DPPH) e de 735 nm (método ABTS).

Antes de realizar o processo de extracção alguns processos foram testados, tais como, a utilização de amostras frescas (sem qualquer tratamento de secagem) e a utilização do evaporador rotativo.

Relativamente à amostra fresca, a presença de água tornava as soluções mais diluídas, resultando em percentagens de inibição (PI) do radical DPPH<sup>•</sup> muito baixas (12%). Desta forma, procedeu-se à liofilização da amostra e obtiveram-se valores de percentagem de inibição superiores. Este processo também foi adoptado pelos autores Sachindra & Bhaska (2008) na determinação da actividade antioxidante de camarão fermentado.

Testou-se se a temperatura do evaporador rotativo a 35 °C, interferia ou não com a percentagem de inibição (PI) no ensaio do radical DPPH<sup>•</sup>. Sendo que, o uso deste equipamento a 35 °C permitiu aumentar os valores de percentagem de inibição. Sowmya & Sanchindra (2012) também utilizaram este processo, no tratamento da amostra, para a determinação da actividade antioxidante em extractos de camarão, porém a uma temperatura de 40 °C. Uma vez que os carotenóides são termolábeis optou-se por uma temperatura mais baixa (Quirós & Costa, 2006).

Em relação ao solvente de extracção usado escolheu-se o metanol, visto que tanto o metanol como o etanol, são solventes que não interferem na reacção do radical DPPH<sup>•</sup> (Molyneux, 2003) e do radical livre ABTS<sup>•+</sup> (Re *et al.*, 1999; Prior *et al.*, 2005). A utilização de outros solventes, tais como, extractos com água ou acetona permitem obter valores de percentagem de inibição (IP) mais baixos no caso do método do DPPH (Molyneux, 2003).

##### **2.2.4.1 Preparação dos extractos para determinação da actividade antioxidante**

As amostras de lagostim, camarão selvagem e de aquacultura foram liofilizadas a uma temperatura de - 50°C durante 20 horas. Posteriormente, as amostras liofilizadas foram trituradas num liquidificador, até se obter um pó homogéneo (Figura 7). O pó liofilizado

obtido foi armazenado num recipiente hermeticamente fechado à temperatura de - 20 °C. O pó liofilizado (5 gramas de massa) foi extraído com 100 mL de metanol.

A mistura foi agitada no vórtex durante dois minutos, submetida ao agitador mecânico durante 20 minutos e subsequentemente filtrada através de papel *Whatman* n°1. Os extractos metanólicos foram evaporados a 35 °C num evaporador rotativo, de forma a obter um resíduo, que posteriormente foi re-dissolvido com 10 mL de metanol. A solução final obtida é filtrada com filtros de seringa (poro de 0,45 µm). A partir desta solução (Figura 7) foram preparadas várias concentrações dos extractos metanólicos.

Cada amostra (lagostim, camarão selvagem, camarão aquacultura) foi analisada em triplicado. Durante o processo de extracção e de análise os extractos metanólicos foram devidamente protegidos da luz.



**Figura 7** A) Camarão (Aquacultura); B) Lagostim; 1) Amostras após liofilização; 2) Amostras liofilizadas e trituradas; 3) Extractos metanólicos finais.

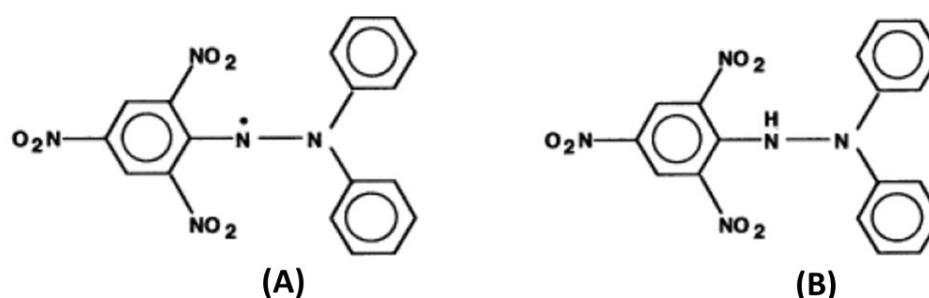
#### 2.2.4.2 Actividade captadora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>•</sup>)

O DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável de azoto, caracterizado por um máximo de absorvância próximo de 517 nm e possui uma coloração violeta intensa (Prior *et al.*, 2005).

Quando a solução de DPPH<sup>•</sup> é misturada com uma substância capaz de doar um átomo de hidrogénio ou um electrão (antioxidante), o DPPH<sup>•</sup> transforma-se na sua forma reduzida (não radicalar), com a consequente perda da coloração violeta da solução original e

obtenção de uma coloração amarela pálida. A reacção de redução do radical DPPH<sup>•</sup> é monitorizada através da diminuição da absorvância, medida com um espectrofotómetro UV-Vis a 517nm. A Figura 8 mostra a estrutura da molécula de DPPH<sup>•</sup> na forma radicalar e na forma reduzida.

Desta forma, esta reacção destina-se a fornecer a ligação com outras reacções que ocorrem num sistema de oxidação, como a oxidação de lípidos ou outros compostos insaturados, onde o DPPH<sup>•</sup> representa os radicais presentes num sistema cuja actividade é suprimida por substâncias antioxidantes (Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004).



**Figura 8** Estrutura da molécula de DPPH<sup>•</sup> na forma de radical livre (A) e na forma reduzida, não radicalar (B) (Molyneux, 2004).

A capacidade dos extractos metanólicos de lagostim, camarão selvagem e de aquacultura em captar o radical livre DPPH<sup>•</sup> foi medida através do método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995) com algumas alterações.

A partir dos extractos obtidos (solução mãe) na secção anterior (2.2.4.1) foram preparadas quatro soluções com diferentes concentrações. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> com uma concentração de  $6 \times 10^{-5}$  M (2,4 mg de DPPH dissolvido em 100 mL de metanol).

Para a determinação da actividade antioxidante, num tubo de ensaio juntou-se 2 mL da solução de DPPH<sup>•</sup> (de  $6 \times 10^{-5}$  M) a 0,1 mL de extracto metanólico. Homogeneizou-se bem a mistura e realizou-se a leitura da absorvância no espectrofotómetro a 517 nm, no início da reacção ( $t=0$ ) e após 30 minutos da reacção.

Todas as reacções foram feitas em triplicado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Este procedimento de leitura foi realizado com 5 concentrações diferentes, para cada extracto. O metanol foi usado como branco.

A percentagem de inibição (PI) calcula-se usando a seguinte equação:

$$PI(\%) = \frac{(Abs_0 - Abs_1)}{Abs_0} \times 100$$

(Eq. 1)

Onde:

$Abs_0$  = Absorvância da mistura de extracto com o radical DPPH' no início da reacção (t=0 minutos);

$Abs_1$  = Absorvância da mistura de extracto com o radical DPPH' após 30 minutos de reacção.

A percentagem de inibição (PI) consiste na quantidade de radical livre DPPH' captado pelas espécies antioxidantes, sendo que a percentagem de inibição é directamente proporcional à concentração de antioxidantes presentes no extracto.

Após o cálculo das percentagens de inibição para cada concentração, é definida a representação gráfica da percentagem de inibição (PI) em função da concentração de substrato (compostos antioxidantes).

A partir da equação da recta obtido calcula-se o  $EC_{50}$  (concentração eficiente), que consiste na concentração de substrato necessária para provocar uma percentagem de inibição de 50%. Segundo Molyneux (2004) o  $EC_{50}$  é um parâmetro que tem vindo a ser introduzido recentemente para interpretação e comparação dos resultados obtidos de diferentes amostras pelo método DPPH.

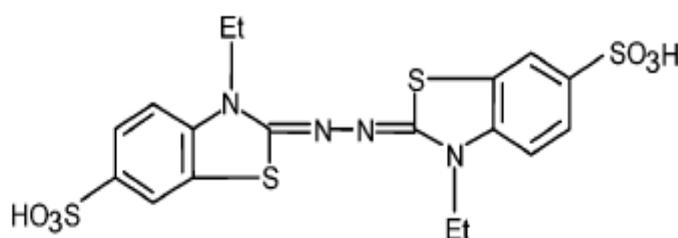
Deste modo, o cálculo do  $EC_{50}$  é realizado na seguinte maneira: equação da recta  $y = ax \pm b$  onde:  $y = 50\%$  (percentagem de inibição);  $x = EC_{50}$  (mg/mL).

#### 2.2.4.3 Actividade captadora do catião radicalar ABTS<sup>•+</sup>

O método ABTS [Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)] tem sido amplamente utilizado pelos investigadores, visto que este método é aplicável tanto a compostos antioxidantes de natureza hidrofílica como lipofílica, incluindo carotenóides e flavonóides. Desta forma, o radical ABTS<sup>•+</sup> pode ser solubilizado em meios orgânicos ou aquosos, enquanto o método do DPPH apenas pode ser solubilizado em meios orgânicos (meios alcoólicos, especificamente) (Re *et al.*, 1999; Prior *et al.*, 2005; Kuskoski *et al.*, 2005).

O catião radicalar  $ABTS^{•+}$  pode ser gerado por meio de uma reacção química ou enzimática, sendo que normalmente se usa para a reacção de oxidação o persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) originando uma solução azul-esverdeada.

O catião radicalar formado (Figura 9) é um cromóforo estável quimicamente, apresentando uma absorvância máxima nos comprimentos de onda de 645 nm, 734 nm e 815 nm. A adição de compostos antioxidantes provoca a redução do catião radicalar  $ABTS^{•+}$ , o que se traduz na descoloração da solução e perda da capacidade de absorver (decréscimo de absorvância) nos comprimentos de onda descritos. Sendo que, quanto maior a actividade antioxidante do composto testado maior será o decréscimo da absorvância. É de notar que, a influência da concentração do composto antioxidante e a duração da reacção são determinantes na medição da actividade antioxidante (Re *et al.*, 1999; Prioir *et al.*, 2005).



**Figura 9** Estrutura do catião radicalar, após reacção com o persulfato de potássio (Prioir *et al.*, 2005).

Os resultados da actividade antioxidante total de compostos usando o método ABTS são expressos em valor TEAC, que consiste na capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (expresso em mM), sendo este composto sintético um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Prioir *et al.*, 2005).

No presente trabalho a metodologia aplicada foi baseada no método descrito por Re *et al.* (1999). O radical  $ABTS^{•+}$  foi formado quimicamente pela dissolução em água de 7 mM de ABTS com 2,24 mM de persulfato de amónio. Isto é, foi dissolvido 3,31 mg de persulfato de amónio em 5mL de água destilada, e seguidamente dissolveu-se 19,2 mg de ABTS na respectiva solução aquosa. Esta solução foi incubada à temperatura ambiente e protegida da luz, por um período de 14 horas.

Após esse tempo, no dia da análise, a solução foi diluída com etanol, onde foi adicionado 1 mL de solução do radical ABTS<sup>•+</sup> a 80 mL de etanol, de forma a obter uma solução com absorvância próxima de 0,700 a 734 nm. O etanol foi usado como branco.

A partir dos extractos metanólicos obtidos na secção 2.2.4.1, devidamente diluídos, transferiu-se para um tubo de ensaio 0,1 mL dos extractos para 1,7 mL de solução de radical ABTS<sup>•+</sup> e homogeneizou-se. A mistura permaneceu à temperatura ambiente e protegida da luz durante 15 minutos. Após esse tempo, a leitura da absorvância foi medida a 734 nm.

A partir das absorvâncias obtidas, é calculada a percentagem de inibição (PI), de acordo com a seguinte equação:

$$PI(\%) = \frac{(Abs_A - Abs_B)}{Abs_B} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

Abs<sub>A</sub> = Absorvância do extracto metanólico (ou Trolox) com a solução de radical ABTS<sup>•+</sup>, após 15 minutos de reacção;

Abs<sub>B</sub> = Absorvância da solução de ABTS<sup>•+</sup>.

A recta padrão foi construída através da percentagem de inibição (PI) da reacção entre solução ABTS<sup>•+</sup> e diferentes concentrações de Trolox em metanol (0,08; 0,16; 0,24; 0,32; 0,4 mM) por um período de tempo de 15 minutos.

Assim sendo, a partir da equação da recta obteve-se o valor da actividade antioxidante para cada extracto metanólico (lagostim, camarão selvagem e camarão de aquacultura), que foi expresso em TEAC (mM de Trolox/g de extracto). Quanto maior for o valor de TEAC maior será a actividade antioxidante do extracto.

Deste modo, o cálculo da actividade antioxidante em cada extracto é realizado da seguinte forma: Equação da recta  $y = ax \pm b$ , onde:  $y$  = (percentagem de inibição obtida em cada extracto metanólico);  $x$  = mM de Trolox/g de extracto.

## 2.3 Determinação da astaxantina e do $\alpha$ -tocoferol no lagostim *Procambarus clarkii*

### 2.3.1 Amostras biológicas em estudo

As amostras de lagostim selvagem *Procambarus clarkii* usadas para a determinação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol foram capturados nos campos de arroz de Montemor-o-Velho (Coimbra), na estação de Inverno, no mês de Janeiro. Para a análise foram misturados indivíduos em diferentes estádios de crescimento (juvenis e adultos), os pesos de cada indivíduo usados na análise foram registados, sendo que variam entre 0,83 e 18,68 gramas (Tabela 5).

A Figura 10 mostra alguns dos exemplares de lagostins em distintos estádios de crescimento. A percentagem (%) do peso de cada componente (cafalotórax, exoesqueleto e parte edível) em relação ao peso total é apresentada na Tabela 6.



**Figura 10** Amostras de lagostins *Procambarus clarkii* cruas usados para a quantificação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol.

**Tabela 5** Massa (g) das amostras de lagostim *Procambarus clarkii* usadas na análise em UHPLC-DAD.

Lagostim	Lagostins cru	Lagostins cozidos
	Peso total (g)	Peso total (g)
1	11,99	18,68
2	12,74	10,23
3	15,86	13,30
4	9,81	18,59
5	6,33	15,20
6	8,67	14,18
7	9,8	15,63
8	4,14	16,67
9	6,18	13,43
10	7,52	12,12
11	5,56	1,81
12	3,14	2,45
13	7,14	1,48
14	9,28	1,49
15	6,20	1,34
16	5,36	0,83
17	6,44	0,66
18	5,66	0,88
19	7,56	0,84
<b>Total (g)</b>	149,38	159,81
<b>Intervalo pesos (g)</b>	3,14-15,86	0,66-18,68

**Tabela 6** Percentagem (%) do peso de cada componente do lagostim em relação ao peso total. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (%).

	Cefalotórax (%)	Exoesqueleto (%)	Parte edível (%)
Lagostim cru	56,59 $\pm$ 6,3	23,23 $\pm$ 9,5	20,18 $\pm$ 4,8
Lagostim cozido	76,67 $\pm$ 6,0	16,26 $\pm$ 3,9	7,07 $\pm$ 4,0

### 2.3.2 Reagentes e Padrões

Para as análises de quantificação foi usado o padrão de astaxantina (CAS No. 7542-45-2) fornecido pelos laboratórios Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha), no estado sólido, com uma pureza de 94,5%. O padrão do  $\alpha$ -tocoferol (CAS No. 10191-41-0) foi fornecido pelos laboratórios Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com uma pureza de 96%.

Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico HPLC. O acetonitrilo, metanol, diclorometano e o acetato de amónio, usados para a preparação da fase móvel para análise em HPLC, foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada foi tratada com um sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

### 2.3.3 Material laboratorial

A determinação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol foi realizada no laboratório de Nutrição e Alimentação do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) em Lisboa. Os materiais utilizados para a preparação das amostras foram tubos de centrifuga Ultra-High Performance VWR<sup>®</sup> (Maidstone, Inglaterra) com capacidade de 15 mL, pipetas graduadas de escoamento total, pipetas Pasteur, Erlenmeyers, balões volumétricos, provetas, funis de vidro, filtros de papel (125 mm de diâmetro, 11  $\mu$ m de poro) da marca Whatman n<sup>o</sup>1 (Maidstone, Inglaterra), filtros para seringa (0,2  $\mu$ m de poro) de membrana Teflon (PTFE) da Millipore (Billerica, EUA) e *vials* para HPLC.

Na preparação da amostra também foi usado o agitador vortex IKA<sup>®</sup> Vortex Genius 3 (Staufen, Alemanha), balança analítica Mettler Toledo<sup>®</sup> (Modelo PB 3002/Fact), Grindomix GM200, Retsch (Haan, Germany) e o ultra-sons Brandson 3510 (Dietzenbach, Alemanha). Para a preparação da fase móvel foi usado um sistema de filtração de eluentes para HPLC acoplada a bomba de vácuo e filtros de membrana (0,22  $\mu$ m) da Millipore.

O equipamento cromatográfico utilizado encontra-se descrito na secção 2.3.6.

### 2.3.4 Preparação de soluções

#### 2.3.4.1 Soluções padrão

A solução stock de padrão de astaxantina foi preparada através da dissolução de 5 mg de astaxantina em 25 ml de diclorometano (200  $\mu$ g/mL). Esta solução foi armazenada à temperatura de  $-80 \pm 0,5$  °C, devidamente protegida da luz, durante todo o processo de

desenvolvimento da metodologia analítica. A partir da solução “stock” foram preparadas diluições subsequentes em metanol, soluções de trabalho, num intervalo de 0,05-20 µg/ml para a respectiva curva de calibração. As soluções de trabalho foram preparadas em balões volumétricos, devidamente protegidos da luz, uma vez que a astaxantina é um composto sensível à luz.

A solução stock de padrão de  $\alpha$ -tocoferol foi preparada através da dissolução de 5 mg de  $\alpha$ -tocoferol em 20 ml de metanol (250 µg/ml). A partir desta foram preparadas 8 subsequentes diluições em metanol, soluções de trabalho, num intervalo de 0,6-30 µg/mL para a respectiva curva de calibração. As soluções foram preparadas devidamente protegidas da luz.

Antes da análise em UHPLC, as soluções de trabalho de astaxantina e  $\alpha$ -tocoferol foram filtradas com filtros para seringa (0,2 µm de poro) de membrana Teflon (PTFE).

#### **2.3.4.2 Preparação da fase móvel**

A composição da fase móvel foi baseada no estudo de Sanches-Silva *et al.*, (2012b) e de López-Cervantes *et al.*, (2006a).

A fase móvel A foi preparada através da adição de diclorometano, metanol com 0,05 M de acetato de amónio e acetonitrilo, na proporção 5:20:75 (v/v/v). A fase móvel B é constituída por água ultrapura tratada com um sistema de purificação Milli-Q. Procedeu-se à filtração de cada fase móvel num sistema de filtração de eluentes para HPLC, sob vácuo, com um filtro de membrana (0,22 µm) da Millipore, com posterior desgaseificação em ultra-sons, durante 25 minutos.

#### **2.3.5 Preparação da amostra para determinação da astaxantina e do $\alpha$ -tocoferol em UHPLC- DAD**

Para o presente estudo foram usados um total de 309 gramas de lagostins crus e cozidos, seleccionados aleatoriamente, e divididos em três partes para as análises: parte edível, exoesqueleto e cefalotórax (Figura 11).

As três partes foram analisadas individualmente. Os lagostins inteiros, cozidos e crus, também foram analisados de forma a estabelecer uma comparação. A Tabela 5 mostra os pesos de cada individuo usados nas análises.

Os lagostins inteiros e os componentes foram homogeneizadas e trituradas em triturador Grindomix a 10000 rpm durante aproximadamente dois minutos. As amostras preparadas foram conservadas à temperatura de congelação de  $- 80 \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e devidamente protegidas da luz de forma a evitar a oxidação durante o período de estudo. Nos dias da análise, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e protegidas da luz.



**Figura 11** Componentes analisados do lagostim: A) Cefalotórax cru; B) Exoesqueleto cru; C) Parte edível crua; D) Cefalotórax cozido.

### 2.3.5.1 Processo de extracção

As amostras foram preparadas de acordo com o método descrito por López-Cervantes *et al.* (2006a) e Sanches-Silva *et al.* (2012b) Sendo que, estes autores testaram vários parâmetros (solvente de extracção, quantidade de amostra, volume de solvente, método de homogeneização) de forma a otimizar o método de extracção.

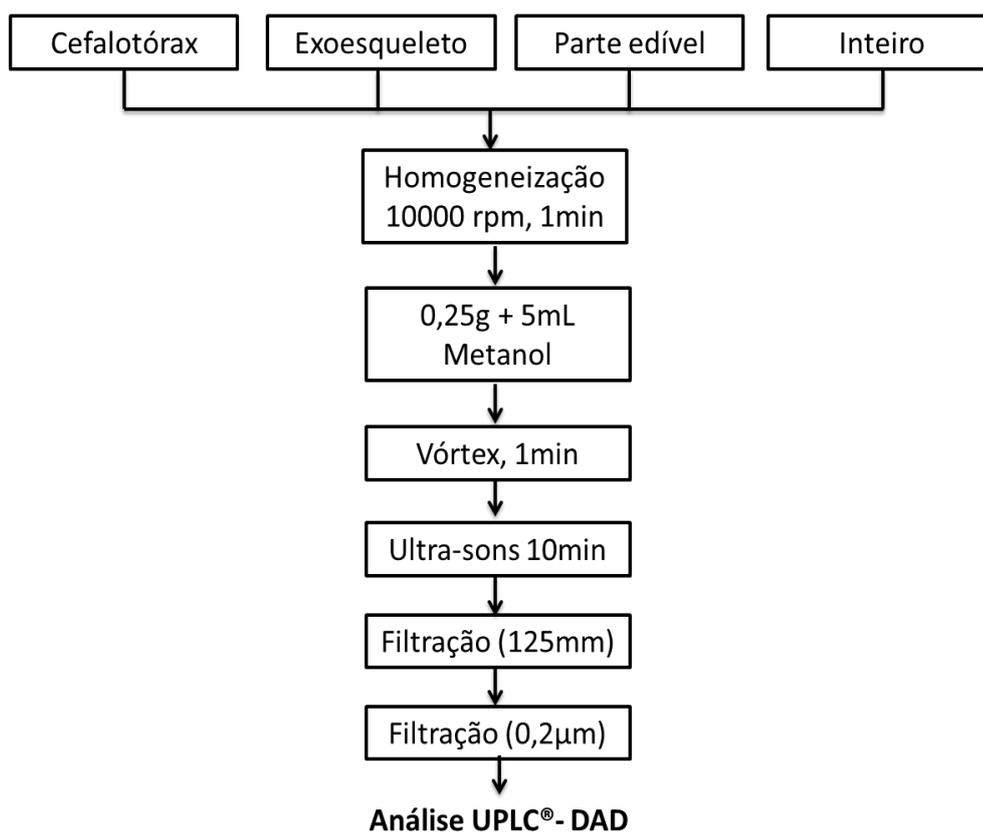
Sanches-Silva *et al.* (2012b) testaram diferentes solventes de extracção de astaxantina em amostras de camarão cru e cozido, tais como, acetona, acetonitrilo, hexano e metanol. O metanol permitiu uma maior extracção de astaxantina, ou seja, permitiu obter a maior área do pico de astaxantina.

López-Cervantes *et al.* (2006a) também testaram metanol, hexano, etanol, metil-etil-cetona e acetonitrilo para a extracção de astaxantina em camarão fermentado, sendo que de todos os solventes testado o metanol e o hexano foram os que mostraram melhores resultados de extracção. Contudo, o metanol foi o solvente escolhido, visto que o hexano (apolar) é incompatível com a fase móvel (polar).

Relativamente à quantidade óptima de amostra para extracção, Sanches-Silva *et al.* (2012b) testaram diferentes quantidades de amostra (0,1; 0,12; 0,15; 0,2; 0,25 g), sendo que a quantidade de 0,25 g extraída com 5 mL de metanol, obteve os melhores resultados para camarão cru e cozido. Segundo Sanches-Silva *et al.* (2012b) o método de homogeneização é um factor crítico de forma a obter uma boa precisão e recuperação, por esta razão vários métodos foram testados. O vórtex seguido do banho de ultra-sons foi considerado o método mais adequado.

Desta forma, no presente trabalho, foi efectuada a extracção sólido-líquido dos analitos através da pesagem de 0,25g de cada amostra para um tubo roscado de 15 mL, onde foram adicionados 5 mL de metanol. A amostra foi agitada no vórtex durante 1 minuto. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao banho de ultra-sons durante 10 minutos, de forma a permitir a extracção completa, seguidamente foram filtradas com filtro de papel (125 mm de diâmetro, 11 µm de poro).

Por fim, as amostras foram filtradas para *vials* HPLC em filtros para seringa (0,2 µm de poro) de membrana Teflon (PTFE), e foram injectados 10 µL no sistema UHPLC-DAD. Durante o processo de extracção as amostras foram devidamente protegidas da luz, de forma a evitar a oxidação durante o processo. A Figura 12 esquematiza todo o processo de preparação da amostra.



**Figura 12** Tratamento e processo de extracção da amostra.

### 2.3.6 Análise cromatográfica

#### 2.3.6.1 Sistema Cromatográfico

O equipamento e a coluna de fase reversa (partículas  $<2 \mu\text{m}$ ) usada foram os mesmos que Sanches-Silva *et al.* (2012b), visto que permitem melhorar alguns parâmetros globais de análise. Deste modo, o sistema cromatográfico utilizado no presente estudo para separação e quantificação dos analitos (Figura 13) é caracterizado pelos seguintes componentes:

- UPLC®, Acquity™ da Waters (Milford, MA, USA), equipado com uma bomba binária, injetor automático com sistema de refrigeração para as amostras e sistema de termostatização da coluna;
- Detector de diodos (DAD) da Waters (Milford, MA, USA);

- A aquisição dos dados, ou seja, a gravação dos sinais de detecção e as áreas dos picos foram processadas através do *software Empower™* versão 2.0 (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado a um computador.



**Figura 13** UPLC®, Acuity™ da Waters.

A recente tecnologia cromatográfica de separação analítica aplicada neste trabalho, ou seja, o sistema UHPLC-DAD baseia-se nos mesmos princípios do HPLC, e utiliza uma fase estacionária com partículas menores que 2  $\mu\text{m}$  (BEH, 1,7  $\mu\text{m}$ ). Estas pequenas partículas consistem em partículas de sílica com pontes de etano inseridas na sua estrutura, denominada por sílica híbrida de segunda geração. Possuem uma maior estabilidade mecânica e conferem um aumento na resolução dos picos cromatográficos (Maldaner & Jardim, 2009).

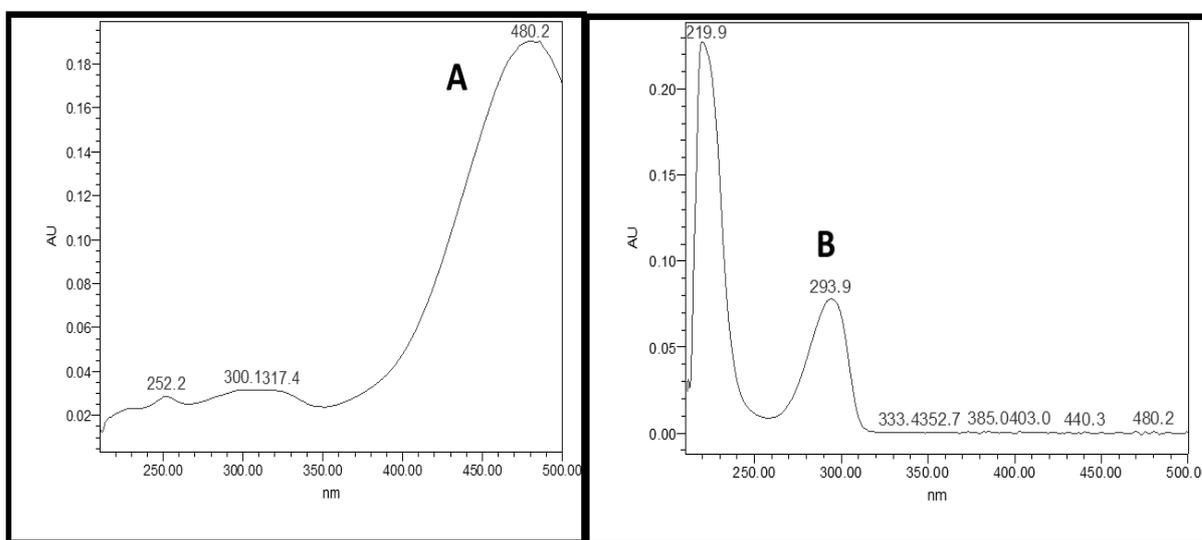
O uso destas partículas juntamente com altas velocidades lineares da fase móvel, permitem melhorar significativamente alguns parâmetros globais, tais como, o aumento da sensibilidade, redução dos tempos de análise e o aumento da resolução na análise de diversos compostos. Segundo alguns autores, com este sistema a detectabilidade (sensibilidade) da análise é de 2-3 vezes maior, quando comparada com as análises realizadas em HPLC (Swartz, 2005; Maldaner & Jardim, 2009).

### 2.3.6.2 Condições Cromatográficas

As fases móveis e a eluição em modo gradiente, o fluxo, o tempo de corrida e a temperatura da coluna (Tabelas 7 e 8) foram definidas de acordo com o método descrito por Sanches-Silva *et al.* (2012b).

Os solventes usados na fase móvel, nomeadamente, o acetonitrilo, diclorometano, metanol e a água também já foram usados por outros autores, tanto em eluição isocrática (Yuan & Chen, 1997; López-Cervantes *et al.*, 2006a) como de gradiente (Li & Chen, 2001; Lin *et al.*, 2005;). A selecção do comprimento de onda para determinar a astaxantina e o  $\alpha$ -tocoferol foram baseados na absorvância máxima observada no espectro na região UV-Vis, como é evidenciado na Figura 14.

É de salientar que, em relação ao comprimento de onda utilizado para quantificar o  $\alpha$ -tocoferol, apesar do espectro de absorção máximo ser a 220 nm (Figura 14), utilizou-se um comprimento de onda de 294 nm, visto que é um comprimento de onda mais selectivo. Isto é, embora a intensidade de resposta seja maior, pode haver mais interferências a 220 nm porque há muitas substâncias que absorvem nesta zona do espectro. Desta forma, ao escolher o comprimento de onda a 294 nm, são minimizadas interferências.



**Figura 14** A) Espectro de absorção máxima na região UV-vis da astaxantina (480 nm); B) Espectro de absorção máxima na região UV-vis do  $\alpha$ -tocoferol (294 nm).

**Tabela 7** Condições experimentais do sistema UHPLC-DAD para determinação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol em amostras de lagostim *P. clarkii*.

<b>Sistema de Cromatografia Líquida (UPLC® - DAD)</b>	
<b>Fase Estacionária</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pré-coluna (UPLC® BEH, 2,1 x 5 mm, partículas de 1,7 <math>\mu</math>m)</li> <li>▪ Coluna fase reversa (UPLC® BEH C<sub>18</sub>, 2,1 x 50 mm, partículas de 1,7 <math>\mu</math>m) da Waters (Milford, MA, USA)</li> </ul>
<b>Fase Móvel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A) Diclorometano / Metanol (com 0,05 M de acetato de amónio) / Acetonitrilo 5:20:75 (v/v/v)</li> <li>B) Água ultrapura</li> </ul>
<b>Fluxo</b>	0,5 ml /min.
<b>Volume de Injecção</b>	10 $\mu$ L
<b>Temperatura da Coluna</b>	20 °C
<b>Temperatura do Injetor</b>	4 °C
<b>Tempo de Corrida</b>	22 min
<b>Comprimento de onda</b>	480 nm (astaxantina) 294 nm ( $\alpha$ -tocoferol)

**Tabela 8** Gradiente de eluição para a fase móvel (A): [diclorometano / metanol (com 0,05 M de acetato de amónio) / acetonitrilo 5:20:75 (v/v/v)] e (B): água ultrapura.

<b>Tempo (min.)</b>	<b>Solvente A (%)</b>	<b>Solvente B (%)</b>
<b>0</b>	25	75
<b>9</b>	17	83
<b>9.1</b>	0	100
<b>18</b>	0	100
<b>18.1</b>	25	75
<b>22</b>	25	75

## 2.4 Validação de metodologias analíticas

A implementação de um método analítico no laboratório passa por diferentes fases relacionadas, tais como, o desenvolvimento, a optimização e a validação do método (Almeida & Bronze, 2005).

O processo de validação de um método analítico, realizado através de ensaios laboratoriais, permite verificar se o desempenho do método obedece aos requisitos da aplicação analítica. Deste modo, o objectivo crucial da validação é demonstrar que a metodologia analítica é adequada para os objectivos pretendidos. Isto é, evidenciar que a metodologia usada satisfaz os critérios de aceitação por entidades reguladoras, como por exemplo a FDA, permitindo uma correcta interpretação dos resultados analíticos, uma vez que conduz à identificação e quantificação de erros e incertezas inerentes ao procedimento analítico que não podem ser eliminados. Para que o trabalho laboratorial seja rigoroso tem de se obedecer a limites de controlo, limites esses que são estabelecidos no processo de validação (Almeida & Bronze, 2005).

Assim, a validação de métodos analíticos deve ser baseada nas recomendações e critérios de organizações internacionais de elevada relevância científica, como a FDA (FDA, 1994), a diretriz “Conferência Internacional de Harmonização” (ICH, 1996), bem como a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, 2005).

Os parâmetros de validação determinados neste estudo foram a selectividade, linearidade, precisão e a exactidão.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Determinação da Humidade

A Tabela 9 apresenta dados reportados da percentagem de humidade presente no lagostim *P. clarkii* inteiro e em várias espécies de crustáceos.

Nos resultados obtidos experimentalmente (Tabela 10), observou-se elevado teor de água, o que é comum neste tipo de produtos. Como era de esperar, a parte edível foi o componente com maior percentagem de humidade (85%), seguido o cefalotórax (74%) e o exoesqueleto (64%). O valor médio da humidade (%) nos três componentes do lagostim foi de  $74\% \pm 10,3\%$ , sendo este valor semelhante ao obtido por El-Kholie *et al.* (2012), que relatou uma humidade no lagostim *P. clarkii* de 77%.

É de salientar, que o teor de humidade pode apresentar variações devido a factores como a alimentação, amostragem e a análise química usada (Zavaleta, 2010).

**Tabela 9** Percentagem de humidade presente em crustáceos inteiros, de origem selvagem e crus.

Amostra	Humidade (%)	Referência
Lagostim <i>P.clarkii</i>	83	Elmossami & Eman (1999)
Lagostim <i>P.clarkii</i>	77	El-Kholie <i>et al.</i> (2012)
Crustáceos, lagostim (várias espécies, cruas)	82	USDA (2013a)

**Tabela 10** Dados obtidos da percentagem de humidade presente nos três componentes do lagostim *P. clarkii* selvagem e cru.

	Cefalotórax <sup>1</sup>	Exoesqueleto <sup>1</sup>	Parte Edível <sup>1</sup>	Média <sup>2</sup>
Humidade (%)	74±0,4	64±1,0	85±1,3	74±10,3

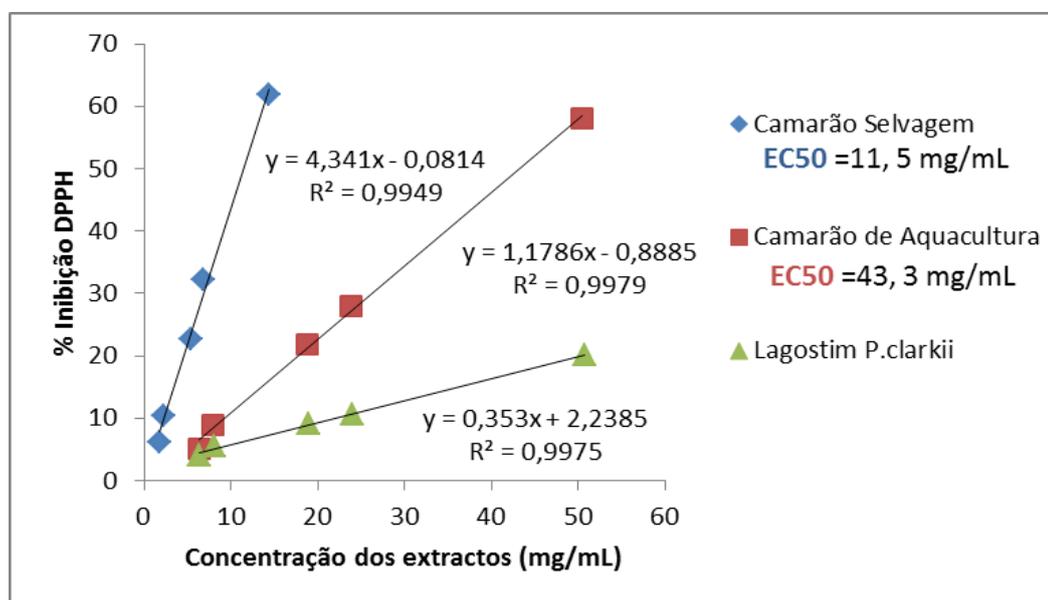
1) Expresso em valor médio  $\pm$  desvio-padrão (n=2)

2) Valor médio da humidade (%) dos três componentes.

### 3.2 Avaliação da actividade antioxidante *in vitro* dos extractos metanólicos de lagostim *P. clarkii* e do camarão selvagem e de aquacultura *Penaeus sp.*

Um dos objectivos deste trabalho foi a comparação da actividade antioxidante *in vitro* do lagostim *Procambarus clarkii*, camarão selvagem e com o de aquacultura (*Penaeus sp.*), através dos ensaios do radical livre DPPH<sup>•</sup> e do radical ABTS<sup>•+</sup> expresso em TEAC. O motivo desta comparação deve-se ao facto da literatura disponível sobre a actividade antioxidante de crustáceos apenas utilizar como matriz o camarão.

Neste estudo, a capacidade dos compostos antioxidantes (presentes nos diferentes extractos) em bloquear os radicais DPPH<sup>•</sup> foi avaliada através da utilização de diferentes concentrações de substrato, nomeadamente 5 níveis de concentração. Foi obtida uma curva de calibração da relação entre concentração e a percentagem de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>. A partir da recta foi calculando o EC<sub>50</sub> de cada extracto metanólico. Na Figura 15 encontra-se a percentagem de inibição de cada substrato, para um intervalo de concentração, e os respectivos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) obtidos, demonstrando uma boa linearidade em todos os extractos ( $r^2 > 0,99$ ) e os valores de EC<sub>50</sub>.



**Figura 15** Curvas de calibração dos diferentes extractos metanólicos (n=3), da relação entre a concentração dos diferentes extractos e a percentagem de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>.

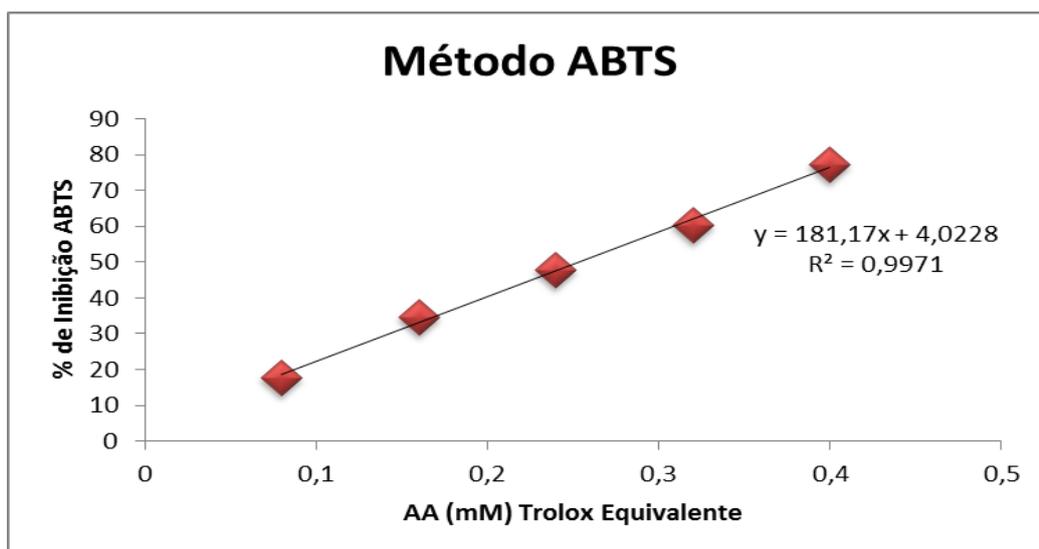
Pelos resultados obtidos, verificou-se através da percentagem de inibição, que o camarão selvagem *Penaeus sp.* foi a amostra com maior actividade antioxidante, apresentado uma percentagem de inibição máxima de 61% para uma concentração de extracto de 14,5 mg/mL. A concentração de extracto necessária para provocar uma percentagem de inibição do radical DPPH<sup>•</sup> de 50% (EC<sub>50</sub>) foi de 11,5 ± 0,39 mg/mL.

O camarão de aquacultura *Penaeus sp.* apresentou uma actividade antioxidante inferior, visto que a percentagem de inibição máxima foi de 58% para uma concentração de extracto de 50,4 mg/mL e um valor de EC<sub>50</sub> de 43,3 ± 2,6 mg/mL.

O lagostim *P. clarkii* foi a amostra que evidenciou a menor actividade antioxidante em relação aos restantes extractos, apresentando uma percentagem de inibição máxima de 20,2% para uma concentração de extracto de 50,7 mg/mL. Não foi possível interpretar em termos de valor do EC<sub>50</sub>, uma vez que pelas concentrações trabalhadas não foi possível obter valores de percentagem de inibição de 50%. Deste modo, para obter o valor de EC<sub>50</sub> seria necessário aumentar a concentração do extracto.

A capacidade dos diferentes extractos em bloquear o radical ABTS<sup>•+</sup> foi determinada por recta de calibração (Figura 16) construída através da relação entre a concentração do antioxidante equivalente Trolox (5 níveis de concentração) e a percentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>. A recta de calibração obteve uma boa linearidade ( $r^2 > 0,9971$ ). O valor da percentagem de inibição obtido para cada extracto foi substituído na recta obtendo-se o valor de actividade antioxidante expressa em TEAC (mM de Trolox/g de extracto).

Quanto maior for o valor de TEAC maior será a actividade antioxidante. É de notar, que os extractos metanólicos utilizados no método ABTS possuíam a mesma concentração (7,1 mg/mL).



**Figura 16** Curva de calibração da relação entre a concentração da solução de Trolox (mM) e a percentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> a 734 nm. Cinco níveis de concentração de Trolox em metanol entre 0,08-0,4 mM.

**Tabela II** Actividade antioxidante dos diferentes extractos metanólicos de concentração de 7,1 mg/ml (n=3) expressa em TEAC (mM Trolox/g de extracto), e as respectivas percentagens de inibição.

Amostras	TEAC <sup>1</sup> (mM Trolox /g extracto)	% Inibição ABTS <sup>•+</sup> <sup>2</sup>
Lagostim <i>P.clarkii</i>	43,6 ± 5,3	61 ± 1,3
Camarão selvagem <i>Penaeus sp.</i>	70,4 ± 0,3	95 ± 0,4
Camarão aquacultura <i>Penaeus sp.</i>	65,5 ± 1,1	88 ± 7

1) Expresso em valor médio ± desvio-padrão (mM Trolox/g), n=3.

2) Expresso em valor médio ± desvio-padrão (%), n=3.

Como se pode observar pela Tabela II, o camarão selvagem obteve o maior valor de actividade antioxidante (70,4 ± 0,3 mM Trolox /g extracto), seguido o camarão de aquacultura (65,5 ± 1,1 mM Trolox /g extracto) e o lagostim *P. clarkii* (43,6 ± 5,3 mM Trolox /g extracto). Esta relação está em concordância com os resultados obtidos pelo método do

DPPH, visto que por esse método o camarão selvagem também foi extracto com maior actividade antioxidante e o lagostim o extracto com menor actividade antioxidante.

Pode-se também verificar que o método ABTS permitiu obter melhores resultados de actividade antioxidante, ao nível da percentagem de inibição em relação à concentração de extractos, comparativamente com o método DPPH. Além de que, pelo método ABTS a capacidade antioxidante, expressa em TEAC, entre as diferentes amostras não são tão distintas. Empiricamente observou-se que na reacção do radical  $ABTS^{•+}$  com os diferentes extractos, a descoloração da solução (reacção) ocorreu muito mais rapidamente e o grau de descoloração foi maior comparativamente com o radical  $DPPH^{•}$ , tendo em conta que no caso do método ABTS usou-se uma concentração de extracto mais reduzida (7,1 mg/mL).

O motivo desta diferença poderá ser explicado pela interferência do espectro do radical  $DPPH^{•}$  com o dos carotenóides. Segundo o autor Prior *et al.* (2005) o ensaio do radical  $DPPH^{•}$  é rápido e simples, no entanto, muitas vezes a interpretação é complicada quanto aos compostos em estudo porque possuem espectros que se sobrepõem com o do  $DPPH^{•}$  a 517 nm. Em particular os carotenóides interferem.

Por exemplo, Silva (2010) determinou a actividade antioxidante no músculo de camarão *Litopenaeus vannamei*, e refere que inicialmente foram realizadas leituras das absorvâncias das soluções (reacção) a 517 nm, conforme descrito na literatura. Porém com esse comprimento de onda não obteve resultados satisfatórios. Posteriormente, as leituras dos ensaios foram realizadas a 540 nm devido à possível interferência da absorvância dos carotenóides.

Sachindra & Bhaskar (2008) determinaram a actividade antioxidante em camarão fermentado e liofilizado obtendo uma percentagem de inibição do radical  $DPPH^{•}$  (517 nm) de 40% numa concentração final de 1,0 mg/mL, enquanto a percentagem de inibição do radical  $ABTS^{•+}$  foi de 95%, mesmo com uma concentração de extracto de 0,5 mg/mL. Cheung *et al.* (2012) também confirmaram esta relação, sendo que determinaram a actividade antioxidante de subprodutos de camarão cozidos e hidrolisados enzimaticamente, e obtiveram pelo método DPPH (517 nm) baixos valores de percentagem de inibição (26% para uma concentração de extracto de 1 mg/mL) e elevados valores pelo método ABTS (88% para uma concentração de 0,067 mg/mL).

A possível razão associada à diferença na actividade antioxidante entre o camarão selvagem e o camarão de aquacultura, tanto pelo método ABTS como pelo método DPPH, poderá ser das diferentes dietas destes crustáceos.

Relativamente à diferença da capacidade antioxidante entre o lagostim *P. clarkii* e os dois tipos de camarão, não existem estudos que comparem estas duas matrizes, ou que isoladamente determinem a actividade antioxidante do lagostim *P. clarkii*. De acordo com a literatura, a astaxantina e os seus ésteres são os carotenóides maioritários em crustáceos marinhos (Shahidi & Brown, 1998). Contudo, a presença de outros carotenóides poderão influenciar a capacidade antioxidante, assim como outros compostos antioxidantes, provocando um efeito sinérgico (Sowmya & Sachindra, 2012).

Sachindra *et al.* (2005a) referem que a astaxantina livre e esterificada são os carotenóides maioritários (63,5-92,2%) no total de carotenóides em extractos de camarão (*Penaeus monodon*, *Penaeus indicus*, *Metapenaeus dobsonii* e *Parapenaeopsis stylifera*). Relativamente a outros carotenóides, os extractos apresentaram reduzidas quantidades de  $\beta$ -caroteno e zeaxantina. No caso particular da espécie de camarão *P. monodon*, a astaxantina livre e esterificada corresponde a 86-98% dos carotenóides totais, enquanto pequenas quantidades de  $\beta$ -caroteno (3,6%) e de zeaxantina (1,5%) estão presentes no exoesqueleto (Okada *et al.*, 1994). O lagostim *P. clarkii* possui, além de astaxantina livre e esterificada (Meyers & Bligh, 1981),  $\beta$ -caroteno, equinenona e foenicoxantina (Shahidi & Brown, 1998).

De acordo com outros estudos, os extractos de camarão também contêm compostos fenólicos que contribuem para a actividade antioxidante (Seymour *et al.*, 1996; Mezzomo, 2012). O conteúdo em fenólicos totais em extractos de camarão foi determinado através do método de *Folin-Ciocalteu*, e os resultados evidenciaram que possuem elevado teor de compostos fenólicos. Segundo o autor a presença destes compostos em extractos de camarão, especialmente flavonóides, pode ser atribuída ao cefalotórax do camarão, composto principalmente pelo sistema digestivo, que contribui para a presença de compostos obtidos através da alimentação, tais como plantas marinhas e microalgas (Mezzomo, 2012).

Além disso, tem sido demonstrado que os péptidos e aminoácidos presentes no camarão também são responsáveis pela actividade antioxidante (Suetsuna, 2000; Mendis *et al.*, 2005; He *et al.*, 2006; Kim & Mendis, 2006; Binsan *et al.*, 2008; Sachindra & Bhaskar, 2008; Cheung *et al.*, 2012)

Os subprodutos de camarão fermentado, além de astaxantina, possuem um elevado teor de aminoácidos e péptidos devido à hidrólise durante a fermentação, resultando na capacidade de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> e do oxigénio singlete (Sachindra & Bhaskar, 2008). A vitamina E também é um poderoso antioxidante lipofílico, que também tem sido identificado no camarão (López-Cervantes *et al.*, 2006b) e no lagostim *P. clarkii* (Hamdi, 2011), onde também foi quantificado no presente estudo.

Apesar de não ser possível, de acordo com a literatura, perceber a causa da diferença da actividade antioxidante entre o lagostim e os dois tipos de camarão sugere-se, em estudos futuros, a determinação dos compostos fenólicos totais, assim como a determinação dos aminoácidos presentes em cada extracto de forma a tentar encontrar uma correlação com os valores obtidos pela actividade antioxidante.

Na generalidade, pode-se concluir que tanto o lagostim *P. clarkii* como o camarão *Penaeus sp.* são uma importante fonte de compostos antioxidantes. O extracto de lagostim demonstrou uma expressiva capacidade antioxidante através do ensaio ABTS, sendo a actividade antioxidante demonstrada dependente da concentração de extracto utilizada. Os dois tipos de camarão evidenciaram uma elevada capacidade antioxidante, tanto pelo método ABTS como pelo método DPPH. Desta forma, os resultados sugerem o potencial uso destas matrizes como fonte de antioxidantes naturais para aplicações biomédicas e na tecnologia alimentar.

### 3.3 Estudo dos parâmetros de validação

Neste estudo, além da identificação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol, foram também realizados ensaios de validação, visto que é imprescindível para a credibilidade dos resultados obtidos numa metodologia analítica. Todavia, devido ao facto de não existir tempo e equipamento disponível, não foi possível realizar um maior número de ensaios que permitissem garantir a precisão inter-dia e o limite de detecção e de quantificação através do método instrumental do sinal-ruído (S/R).

O estudo da validação do método iniciou-se após um período inicial de ensaios preliminares, onde se testou se o método de Sanches-Silva *et al.* (2012b) aplicado ao camarão permitia identificar e quantificar a astaxantina no lagostim invasor *Procambarus clarkii*.

A determinação do  $\alpha$ -tocoferol não consistia num objectivo inicial no presente estudo, porém visto que durante os ensaios de validação da astaxantina, foi identificado o  $\alpha$ -tocoferol na mesma corrida cromatográfica, a quantificação deste composto foi realizada. Desta forma, seguidamente são descritos os parâmetros de validação avaliados para os compostos em estudo em amostras de lagostim *P. clarkii*.

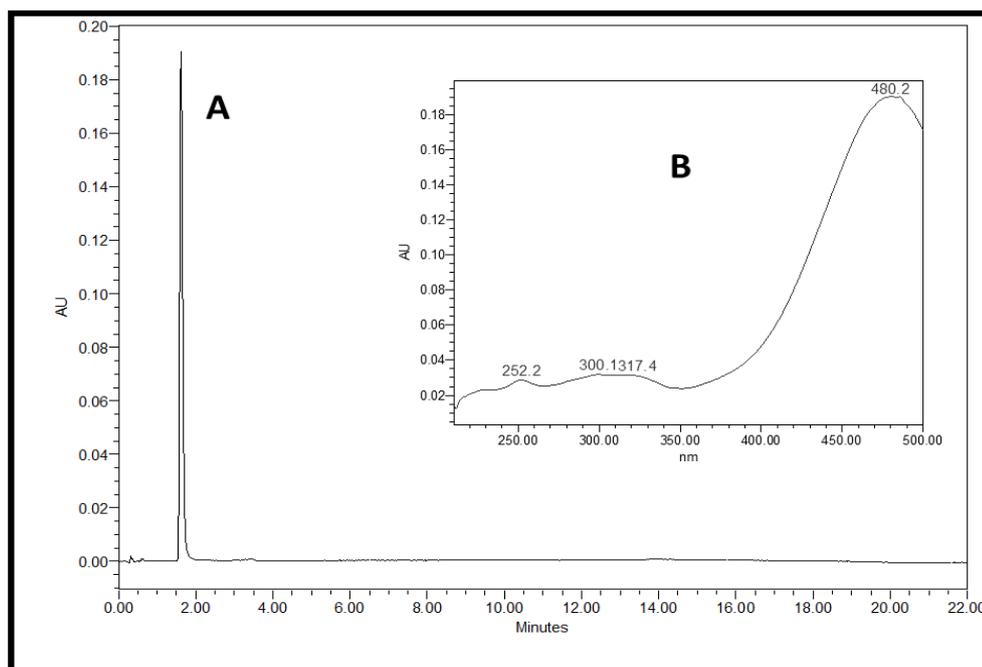
Nas determinações analíticas, a identificação de cada pico baseou-se na comparação do tempo de retenção (RT) e o espectro de absorção UV-vis de cada analito com o respectivo padrão comercial.

### 3.3.1 Estudo da selectividade

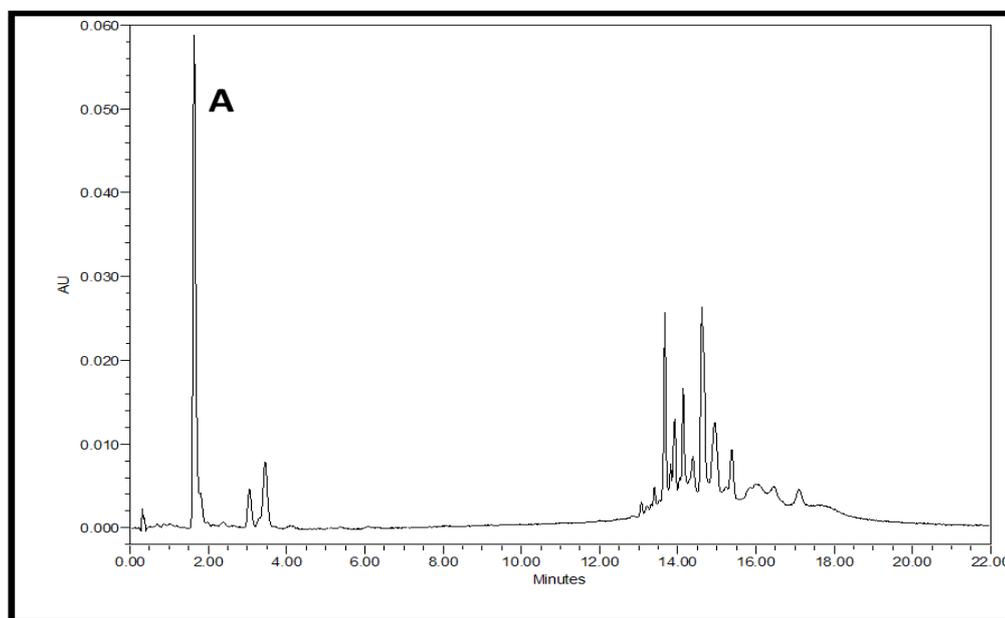
A selectividade e/ou especificidade de um método é a capacidade de um método analítico determinar e discriminar inequivocamente o analito em estudo de outros compostos que possam estar presentes na matriz, tais como, impurezas, produtos de degradação, ou outros componentes da matriz (ICH, 1996; Almeida & Bronze, 2005).

No desenvolvimento do método descrito para elaboração desta dissertação, a identificação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol no lagostim *P. clarkii* foi realizada pela comparação dos tempos de retenção (RT) e dos espectros de absorção na região do UV-vis através do detector de diodos (DAD), com os obtidos pelos padrões de astaxantina e de  $\alpha$ -tocoferol, nas mesmas condições de ensaio.

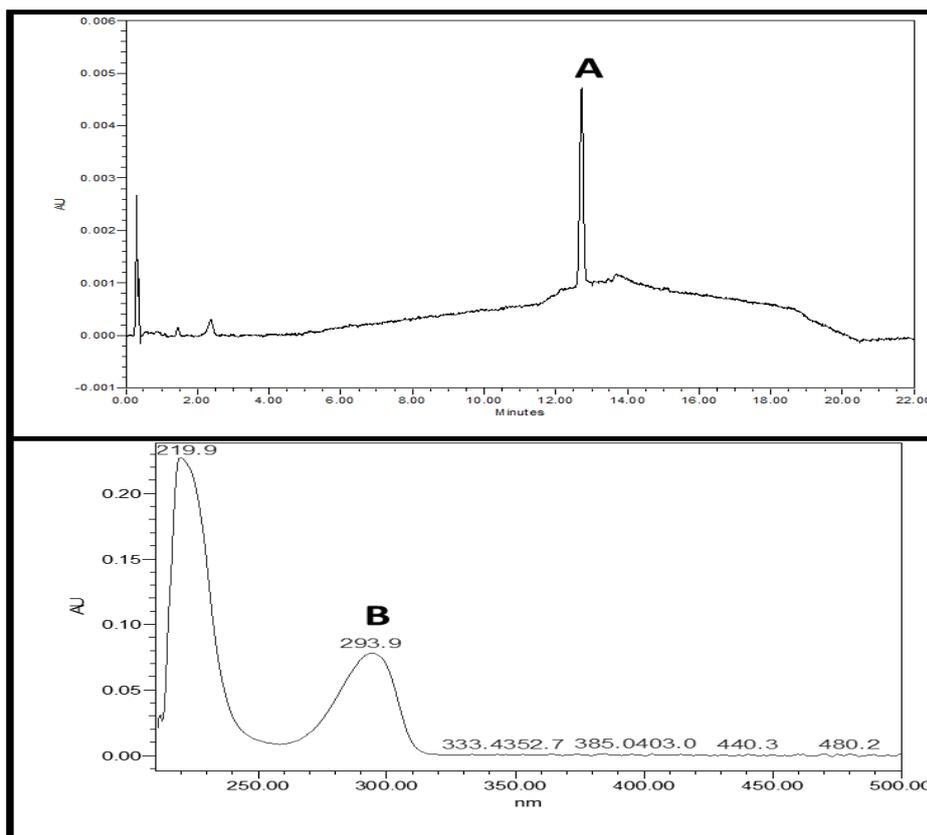
Verificou-se, através dos tempos de retenção e dos espectros de absorção se existia algum interferente que pudesse conduzir a uma errada identificação dos compostos ou que impedisse a respectiva identificação. Este facto evidencia-se através da observação comparativa entre os cromatogramas dos analitos das amostras de lagostim *P. clarkii* e dos padrões da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol, como se pode visualizar nas Figuras 17, 18, 19 e 20.



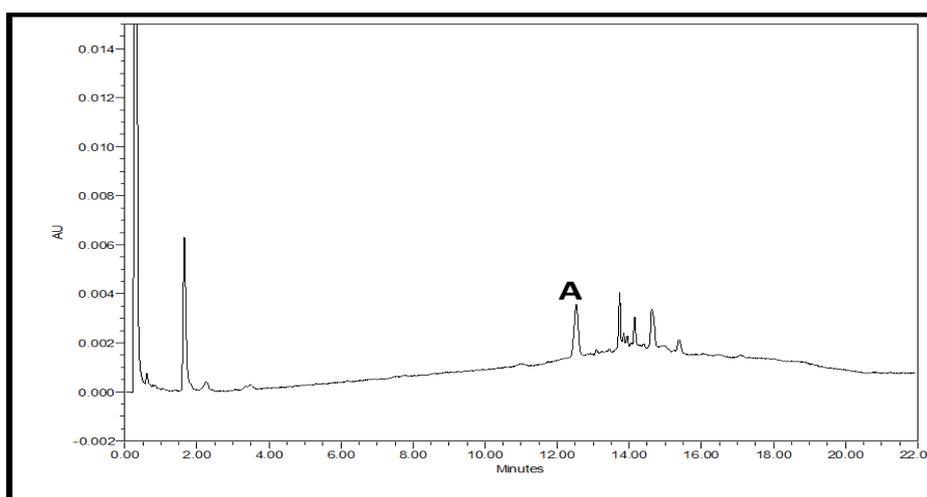
**Figura 17** A) Pico cromatográfico do padrão de astaxantina (5  $\mu\text{g/ml}$ ) a 480 nm, tempo de retenção de 1,9 min.; B) Espectro de absorção UV-Vis do pico da astaxantina entre 210 e 500 nm.



**Figura 18** Pico cromatográfico da astaxantina (480 nm) no exoesqueleto cozido. Tempo de retenção de 1,8 min.



**Figura 19** A) Pico cromatográfico do padrão do  $\alpha$ -tocoferol (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) a 294 nm, tempo de retenção de 13,2 min.; B) Espectro de absorção UV-Vis do pico do  $\alpha$ -tocoferol entre 210 e 500 nm.



**Figura 20** Pico cromatográfico do  $\alpha$ -tocoferol avaliado a 294 nm no exoesqueleto cru. Tempo de retenção de 13,2 min.

As amostras de lagostim analisadas (cefalotórax, exoesqueleto, parte edível e lagostim inteiro) evidenciaram a inexistência de interferentes da própria matriz, dos solventes de extração ou da fase móvel que pudessem comprometer a identificação inequívoca da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol, visto que, como se pode observar pelos cromatogramas, não se observaram picos com o mesmo tempo de retenção dos compostos em estudo, havendo uma perfeita separação dos picos. Pode-se afirmar que o método apresenta selectividade.

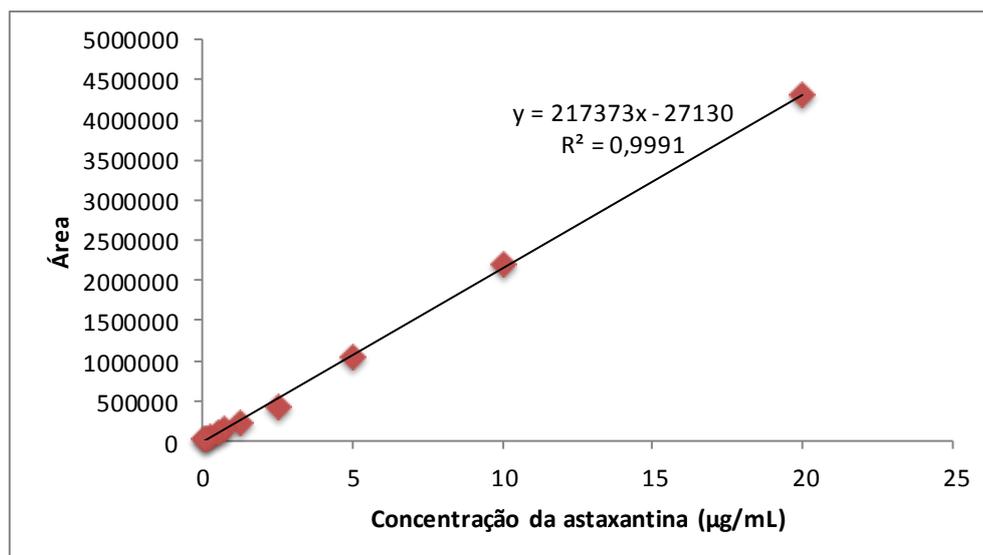
Desta forma, com base no tempo de retenção (1,8 min.) e no espectro de absorção, o principal pico (astaxantina) foi positivamente identificado a 480 nm no exoesqueleto do lagostim (Figura 18). O  $\alpha$ -tocoferol foi também identificado (Figura 20), a um tempo de retenção de 13,2 minutos a 294 nm, no exoesqueleto do lagostim.

### 3.3.2 Linearidade

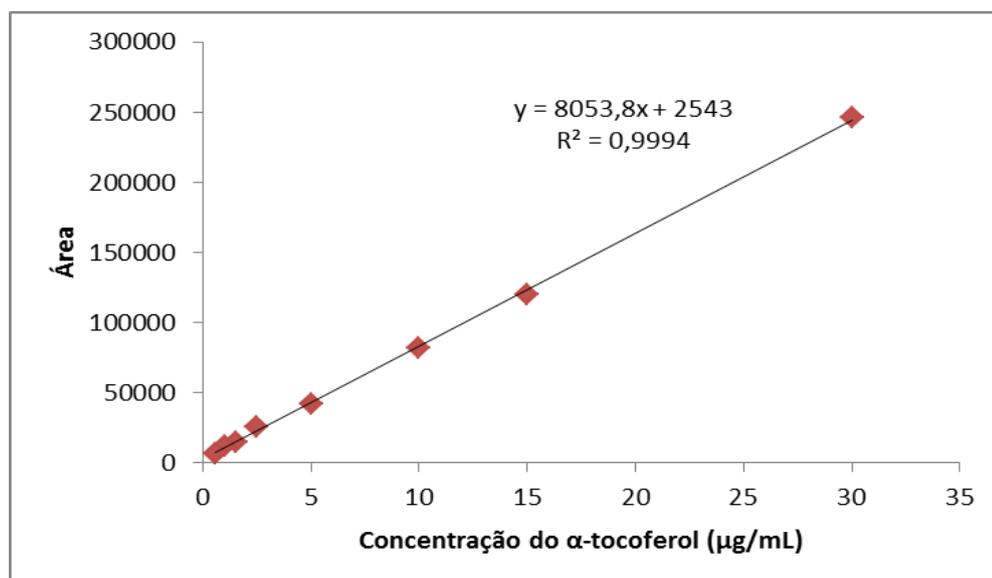
A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de um intervalo de concentrações (ICH, 1996; Ribani *et al.*, 2004). A gama de trabalho (intervalo de linearidade) do método analítico é definida como o intervalo entre a concentração mínima e máxima do analito na matriz (Almeida & Bronze, 2005).

Para determinar o intervalo de concentrações no qual a resposta do detector é linear, foram preparadas 10 soluções de astaxantina padrão com concentrações entre 0,05 e 20  $\mu\text{g/mL}$ . De forma similar, para estabelecer a curva de calibração do  $\alpha$ -tocoferol foram preparadas 8 soluções com concentrações de  $\alpha$ -tocoferol padrão entre 0,6 e 30  $\mu\text{g/mL}$ . Cada ponto da curva de calibração consiste na média de 4 injecções. Os padrões de calibração, de cada analito, foram analisados no mesmo equipamento analítico (UPLC<sup>®</sup>-DAD) e nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

A linearidade do método analítico foi expressa, em termos gráficos, pelos coeficientes de determinação ( $r^2$ ) da equação da recta obtida através do método dos mínimos quadrados, que reflecte o grau de relação entre as variáveis  $x$  (concentração) e  $y$  (resposta: área do pico), considerando-se o resultado conforme se o valor de  $r^2$  for superior a 0,999 (FDA, 1994; ICH, 1996).



**Figura 21** Representação gráfica da curva de calibração do padrão da astaxantina, com dez níveis de concentração entre 0,05 e 20 µg/mL.



**Figura 22** Representação gráfica da curva de calibração do padrão do  $\alpha$ -tocoferol, com oito níveis de concentração entre 0,6 e 30 µg/mL.

Como se pode observar, as curvas de calibração da astaxantina (Figura 21) e do  $\alpha$ -tocoferol (Figura 22) são resultantes da relação entre as áreas dos picos dos analitos *versus* a concentração dos mesmos. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) serviu como indicador de linearidade, observando-se para a astaxantina um coeficiente de determinação de 0,9991 e para o  $\alpha$ -tocoferol de 0,9994. Desta forma, pode-se concluir que as curvas de calibração apresentam boas linearidades e permitem a quantificação dos analitos.

### 3.3.3 Limiares analíticos do método de ensaio

Relativamente ao limite de quantificação (LQ), este foi de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  para a astaxantina e de 0,6  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\alpha$ -tocoferol, sendo estas as concentrações correspondentes ao primeiro nível da curva de calibração.

Comparando o limite de quantificação da astaxantina obtido neste estudo com o de Sanches-Silva *et al.* (2012b), onde foi aplicada a mesma metodologia analítica e o mesmo equipamento cromatográfico, verificou-se um limite de quantificação inferior (Tabela 12). O valor inferior obtido, deve-se ao facto da solução stock de astaxantina ter sido preparada em diclorometano e as soluções de trabalho em metanol, por diluição da solução stock. No caso de Sanches-Silva *et al.* (2012b), a solução stock foi preparada em metanol, desta forma, gerou uma diferença no limite de quantificação.

De acordo com a Tabela 12, verificou-se que o limite de detecção obtido por Sanches-Silva *et al.* (2012b) foi inferior comparativamente com o valor obtido por López-Cervantes *et al.* (2006a), apesar de usarem a mesma fase móvel. O menor valor no limite de detecção pode ter ficado a dever-se ao facto de Sanches-Silva *et al.* (2012b) terem usado uma coluna analítica com partículas de 1,7  $\mu\text{m}$ , enquanto López-Cervantes *et al.* (2006a) usaram partículas de 5  $\mu\text{m}$ .

Vilasoá-Martínez *et al.* (2008) obteve um valor de detecção ainda mais baixo (Tabela 12), contudo, é necessário ter em conta que foi usada uma fase móvel de composição diferente (hexano, metanol, acetonitrilo e diclorometano) e um detector UV-Vis.

**Tabela 12** Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) em crustáceos para a determinação da astaxantina, obtidos pelo método da relação sinal-ruído (S/R), na razão de 3:1 (LD) e 10:1 (LQ).

Método	Amostra	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Referência
HPLC-DAD	Camarão	0,104	ND	López-Cervantes <i>et al.</i> (2006a)
UHPLC-DAD	Camarão	0,054	0,16	Sanches-Silva <i>et al.</i> (2012b)
HPLC-UV-Vis	Caranguejo <i>C. opilio</i>	0,01	ND	Vilasoá-Martínez <i>et al.</i> (2008)

• ND - Não determinado

**Tabela 13** Limites de detecção (LD) em diferentes matrizes para a determinação do  $\alpha$ -tocoferol, obtidos pelo método da relação sinal ruído (S/R), na razão de 3:1.

Método	Amostra	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Referência
HPLC-DAD	Camarão <i>Penaeus sp.</i>	0,08	ND	López-Cervantes <i>et al.</i> (2006b)
HPLC-FLD	Caranguejo <i>Chionoecetes opilio</i>	0,13	ND	Vilasoá-Martínez <i>et al.</i> (2008)
HPLC-UV-Vis	Planta	0,104	ND	Aoun <i>et al.</i> (2005)
HPLC-FLD	<i>Ferula hermonis</i>	0,010		
HPLC-UV-Vis	Algas	0,104	ND	Sánchez-Machado <i>et al.</i> (2002)
HPLC-FLD	<i>Himanthalia elongata</i>	0,010		

No caso do  $\alpha$ -tocoferol, na literatura científica encontram-se descritos limites de detecção entre 0,010  $\mu\text{g/mL}$  e 0,13  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 13). Como se pode verificar os autores Sánchez-Machado *et al.* (2002) e Aoun *et al.* (2005) usaram as mesmas condições cromatográficas, sendo a fase móvel composta por metanol: acetonitrilo (50;50), obtendo menores limites de detecção através do detector por fluorescência (FLD), evidenciando, assim, uma maior sensibilidade com esse detector.

No caso de López-Cervantes *et al.* (2006b) onde aplicaram condições cromatográficas muito semelhantes ao presente estudo, obteve-se um limite de detecção de 0,08  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\alpha$ -tocoferol.

### 3.3.4 Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância (conformidade) entre os resultados individuais dos ensaios, quando o processo é aplicado repetidamente a várias alíquotas de uma amostra homogênea. A precisão é uma medida de grau de reprodutibilidade de um método analítico em condições normais de execução e está associada aos erros acidentais ou aleatórios (Almeida & Bronze, 2005; USP, 2005).

Para a determinação da precisão, foram realizadas análises da mesma amostra, utilizando os mesmos reagentes e equipamentos, sendo estas efectuadas no mesmo dia (precisão intra-dia ou repetibilidade) em triplicado ( $n=3$ ) e em dias diferentes (precisão inter-dia ou precisão intermédia).

Este parâmetro representou a variabilidade dos resultados obtidos das diferentes alíquotas da amostra, e foi expresso em termos de RSD (%) por aplicação da equação I do Anexo I. Desta forma, foi calculada a média das três réplicas para cada analito e o respectivo desvio-padrão (DP) (Tabelas 14, 15, 16,17).

Como se pode verificar pela Tabela 14, para a astaxantina, obteve-se um RSD (%) intra-dia, para os diferentes componentes do lagostim  $\leq 5\%$  (critério de aceitação) com um número de amostras igual a 3 (Almeida & Bronze, 2005). Com excepção do cefalotórax cozido que obteve um RSD (%) de 8,4%.

**Tabela 14** Quantidade média de astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ) e a precisão intra-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim *P. clarkii* cru e cozido ( $n=3$ ).

Amostra	Componente	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	DP ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)
Cru	Exoesqueleto	22,7	0,9	3,9
	Cefalotórax	13,4	0,2	1,4
	Parte edível	4,0	0,1	2,0
	Inteiro	12,9	0,3	2,6
Cozido	Exoesqueleto	30,5	1,2	4,0
	Cefalotórax	15,4	1,3	8,4
	Parte edível	4,0	0,1	3,5
	Inteiro	13,4	0,4	3,0

A precisão inter-dia também foi estudada, em três dias consecutivos, sendo as análises realizadas pelo mesmo operador, à mesma amostra e utilizando os mesmos reagentes e equipamentos. Cada componente do lagostim foi analisada através de 9 réplicas.

No entanto, como se pode observar pela Tabela 15, obtiveram-se valores de RSD (%) superiores a 10%, logo seria necessário realizar um maior número de repetições, de acordo com os critérios estabelecidos (Almeida & Bronze, 2005). Com exceção da parte edível crua que apresentou um RSD (%) de 9,3.

**Tabela 15** Quantidade média de astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ) e a precisão inter-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim *P. clarkii* cru e cozido (n=9).

Amostra	Componente	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	DP ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)
Cru	Exoesqueleto	20,5	2,5	12,4
	Cefalotórax	17,8	3,7	20,9
	Parte edível	3,9	0,4	9,3
	Inteiro	17,4	3,4	19,7
Cozido	Exoesqueleto	29,5	3,4	11,6
	Cefalotórax	12,1	2,6	21,4
	Parte edível	ND	-	-
	Inteiro	13,7	2,4	17,5

• ND- Não determinado.

No caso do  $\alpha$ -tocoferol (Tabela 16), na precisão intra-dia, verificou-se também para os diferentes componentes do lagostim, um RSD (%)  $\leq 5$  para um número de amostras igual a 3 (Almeida & Bronze, 2005). Com exceção do exoesqueleto cozido que obteve um RSD (%) de 6,9%.

**Tabela 16** Quantidade média de  $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ ) e a precisão intra-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim *P. clarkii* cru e cozido (n=3).

Amostra	Componente	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	DP ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)
Cru	Exoesqueleto	33,5	2,9	4,3
	Cefalotórax	58,6	1,7	2,6
	Parte edível	ND	-	-
	Inteiro	25,8	1,1	4,3
Cozido	Exoesqueleto	29,4	2,1	6,9
	Cefalotórax	16,8	0,3	1,9
	Parte edível	17,6	0,3	1,7
	Inteiro	22,1	0,6	2,9

• ND- Não determinado.

Como se pode observar pela Tabela 17, na precisão inter-dia obtiveram-se para as amostras cruas valores de RSD (%)  $\leq 10\%$ , de acordo com os critérios estabelecidos (Almeida & Bronze, 2005), com um número de 9 repetições. No caso das amostras cozidas a precisão inter-dia não é apresentada, visto que a temperatura teve um efeito destrutivo sobre o  $\alpha$ -tocoferol reflectindo-se em teores muito reduzidos.

**Tabela 17** Quantidade média de  $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ ) e a precisão inter-dia (RSD%), nos diferentes componentes do lagostim *P. clarkii* cru e cozido (n=9).

Amostra	Componente	Média ( $\mu\text{g/g}$ )	DP ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)
Cru	Exoesqueleto	33,1	3,4	10,1
	Cefalotórax	60,9	3,1	5,1
	Parte edível	ND	-	-
	Inteiro	23,7	2,5	9,9

• ND- Não determinado.

No caso do estudo de Sanches-Silva *et al.* (2012b), onde foi aplicada a mesma metodologia no camarão, foram obtidas boas repetibilidades intra-dia e inter-dia (n=6), nomeadamente de 3,5% e 4,68%, respectivamente.

No presente estudo, as possíveis causas associadas à variabilidade dos dados, podem estar associadas à homogeneidade da amostra. Neste factor, é importante salientar que o lagostim possui uma estrutura (exoesqueleto e cefalotórax) bastante mais rígida comparativamente com o camarão, o que não permitiu a obtenção de uma pasta mais homogénea. É de notar que, no presente trabalho as amostras usadas incluíram lagostins em diferentes estádios de crescimento, verificando-se elevada variabilidade de pesos entre os indivíduos. Apesar de não existir evidências científicas de diferenças no teor de astaxantina entre os indivíduos adultos e os juvenis, verifica-se que, visualmente os indivíduos adultos apresentam uma coloração avermelhada mais intensa. Desta forma, caso a trituração aplicada aos lagostins não tenha sido eficaz para uma correcta homogeneização, poderá ter provocado a variabilidade do teor da astaxantina na amostra.

Assim, é recomendado nas próximas análises, um processo de trituração mais eficiente, de forma a obter uma pasta ainda mais homogénea. Sendo recomendável a escolha de lagostins no mesmo estágio de crescimento, como por exemplo seleccionar apenas os indivíduos adultos.

### 3.3.5 Recuperação

A recuperação foi o parâmetro utilizado para avaliar a exactidão do método analítico usado. Este parâmetro de exactidão reflecte a quantidade de determinado analito recuperado no processo de extracção, em relação à quantidade presente na amostra (Ribani *et al.*, 2004). É de notar que, no presente estudo, a exactidão apenas foi avaliada para a astaxantina.

Desta forma, este parâmetro foi estimado através da fortificação (concentrações conhecidas e dentro do intervalo de linearidade) das seguintes amostras:

- Exoesqueleto cozido fortificado com 20 µg de astaxantina padrão;
- Cefalotórax cozido fortificado com 9,2 µg de astaxantina padrão;
- Lagostim inteiro cozido fortificado com 3,7 µg de astaxantina padrão.

A fortificação das três concentrações foi realizada antes do processo de extracção sendo que, as fortificações foram realizadas em condições de repetibilidade. Posteriormente, as soluções de amostra fortificada foram injectadas no sistema UHPLC-DAD e analisadas em duplicado nas mesmas condições cromatográficas das amostras sem fortificação.

A recuperação foi, assim, determinada por comparação das áreas dos picos obtidos para as amostras fortificadas com astaxantina, com as áreas dos picos para os padrões directos. Determinou-se a quantidade de astaxantina nas amostras fortificadas e dos padrões, recorrendo à curva de calibração obtida no estudo da linearidade.

Pela aplicação da equação 2 do Anexo I, calculou-se a percentagem de recuperação média da astaxantina, tendo em conta o nível de fortificação adicionado à matriz. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 18, tendo a recuperação sido de 97% ± 6% no exoesqueleto cozido, 99% ± 7% no cefalotórax cozido e de 89% ± 7,2% no lagostim inteiro.

**Tabela 18** Valores de recuperação (%) obtidos no exoesqueleto, cefalotórax e lagostim inteiro, para cada nível de fortificação de astaxantina.

Amostras cozidas	Quantidade fortificada ( $\mu\text{g}$ )	Recuperação Média (%)	Desvio-Padrão (%)	Nº de amostras
Exoesqueleto	20	97	6	6
Cefalotórax	9,2	99	7	6
Inteiro	3,7	89	7,2	5

Desta forma, é possível afirmar pela observação dos valores obtidos de recuperação no exoesqueleto, cefalotórax e lagostim inteiro, que o procedimento extractivo da astaxantina utilizado neste estudo é bastante eficaz.

Comparando os valores de percentagens de recuperação obtidos pela metodologia analítica proposta com os descritos na literatura científica, podemos constatar que os valores são muito próximos. No caso do estudo de Sanches-Silva *et al.* (2012b), onde aplicaram o mesmo processo de extracção e as mesmas condições analíticas na determinação da astaxantina no camarão, obteve valores de recuperação na ordem dos 90,5%, em que seis amostras de camarão foram fortificadas com 8  $\mu\text{g}$  de padrão de astaxantina. López-Cervantes *et al.* (2006a) aplicaram um processo de extracção semelhante em camarão fermentado (apenas difere na quantidade de amostra usada), e obtiveram valores de recuperação de 103,1%.

Vilasoá-Martínez *et al.* (2008) determinaram simultaneamente a astaxantina e o  $\alpha$ -tocoferol no caranguejo *Chionoecetes opilio* e obtiveram bons valores de recuperação para os dois analitos. Porém, o processo de extracção foi diferente do usado no presente estudo. O processo de extracção consistia na extracção da amostra seca com acetona, posterior evaporação a 35 °C, sendo que o resíduo obtido foi redissolvido em metanol-hexano-diclorometano. Os autores também testaram a saponificação, visto ser um processo eficaz para isolar o  $\alpha$ -tocoferol, no entanto, este processo não permitiu a extracção da astaxantina, logo foi descartado. Desta forma, o processo de extracção da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol (em simultâneo) permitiu obter valores de recuperação na ordem de 104,4% e 99,69%, respectivamente.

Relativamente ao  $\alpha$ -tocoferol, López-Cervantes *et al.* (2006b) determinaram este analito em camarão fermentado usando condições analíticas semelhantes ao presente

estudo, porém com um método de extração mais específico para o  $\alpha$ -tocoferol, como a saponificação. Posteriormente à saponificação, a amostra foi redissolvida em fase móvel (metanol/acetonitrilo/água), sendo que este processo de extração permitiu bons valores de recuperação ( $100,8\% \pm 1,7$ ).

### 3.4 Discussão dos resultados obtidos

No presente trabalho um dos objectivos consiste em estabelecer uma comparação da concentração da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol entre os diferentes componentes do lagostim (cefalotórax, parte edível e exoesqueleto), assim como, verificar a influência da cozedura na concentração dos mesmos.

A Tabela 19 sumariza as concentrações de astaxantina encontradas nos diferentes componentes de lagostim, cru e cozido. Verificou-se que em ambas as amostras de lagostim (cozidas e cruas), o exoesqueleto foi o componente com maior concentração de astaxantina, seguido do cefalotórax e da parte edível.

Os resultados obtidos estão em concordância com o estudo de Sachindra *et al.* (2005a) que também avaliaram a concentração da astaxantina nos diferentes componentes de camarão cru, estabelecendo uma comparação entre diferentes espécies de camarão pela técnica de HPLC-UV. O camarão *P. monodon* apresentou uma concentração de astaxantina de 24,6  $\mu\text{g/g}$  no exoesqueleto, 14,0  $\mu\text{g/g}$  no cefalotórax e 3,9  $\mu\text{g/g}$  na parte edível. Já a espécie *M. dobsonii* obteve uma concentração de astaxantina de 27,7  $\mu\text{g/g}$  no exoesqueleto, 12,4  $\mu\text{g/g}$  no cefalotórax e 2,5  $\mu\text{g/g}$  na parte edível. Como se pode observar na Tabela 19, estes valores foram muito similares aos obtidos no presente estudo para o lagostim *P. clarkii* cru e cozido.

Os dados reportados por Sanches-Silva *et al.* (2012b) também confirmam os do presente estudo (Tabela 19), sendo que no caso das amostras cruas, os valores são da mesma ordem de grandeza.

**Tabela 19** Valores da quantidade de astaxantina ( $\mu\text{g/g}$ ) obtida nos diferentes componentes do lagostim *P. clarkii* e os dados reportados do estudo de Sanches-Silva *et al.* (2012b) para o camarão.

		<u>Camarão</u>	<u>Dados obtidos lagostim <i>P. clarkii</i></u>
<b>Amostra</b>	Componente	Astaxantina <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	Astaxantina <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Crua</b>	Exoesqueleto	22,1 $\pm$ 1,7	22,7 $\pm$ 0,9
	Cefalotórax	16,4 $\pm$ 0,6	13,4 $\pm$ 0,2
	Parte edível	3,8 $\pm$ 0,1	4 $\pm$ 0,1
	Inteiro	ND	12,9 $\pm$ 0,3
<b>Cozida</b>	Exoesqueleto	36,5 $\pm$ 3,6	30,5 $\pm$ 1,2
	Cefalotórax	23,4 $\pm$ 0,8	15,4 $\pm$ 1,3
	Parte edível	6,5 $\pm$ 0,3	4 $\pm$ 0,14
	Inteiro	ND	13,4 $\pm$ 0,4

1) Expresso em valor médio  $\pm$  desvio-padrão, (n=6).

2) Expresso em valor médio  $\pm$  desvio-padrão, (n=3).

• ND – Não determinado.

Relativamente ao lagostim inteiro, não existe literatura que estabeleça uma relação da quantidade de astaxantina entre o lagostim inteiro e os seus componentes. Contudo, a concentração de astaxantina obtida no lagostim inteiro é próxima do cefalotórax (Tabela 19), esta similaridade pode estar associada ao facto do cefalotórax ser a fracção do lagostim com maior percentagem em relação ao corpo total (56,59%-76,67%), como é evidenciado na Tabela 6.

Comparando, em termos gerais, a concentração de astaxantina obtida no lagostim com dados reportados da literatura verificam-se variações. As diferenças na concentração de astaxantina, incluindo crustáceos da mesma espécie, podem estar associadas a factores exógenos como a dieta (Coral-Hinostroza *et al.* 2002). Outros factores associados podem ser atribuídos aos processos de tratamento e extracção das amostras (Núñez-Gastélum *et al.* 2011).

No estudo de Sanches-Silva *et al.* (2012b), onde foi aplicado o mesmo processo de extracção e as mesmas condições cromatográficas, verificou-se que o lagostim *P. clarkii* possui uma concentração de astaxantina muito similar ao camarão cru (Tabela 19). Os

autores também determinaram a astaxantina em amostras de camarão fermentadas, onde se obtiveram valores muito superiores de astaxantina ( $453,8 \pm 16,3 \mu\text{g/g}$ ) em relação às amostras cruas e cozidas.

Comparando com o presente estudo, a quantidade de astaxantina encontrada no camarão fermentado foi cerca de 20 vezes maior do que no exoesqueleto cru e 14 vezes maior do que no exoesqueleto cozido. Estas diferenças estão associadas ao processo de fermentação, uma vez que no estudo de Sanches-Silva *et al.* (2012b) obtiveram uma maior concentração de astaxantina no camarão fermentada comparativamente às amostras cruas e cozidas

A explicação atribuída ao efeito da fermentação no aumento considerável dos teores de astaxantina deve-se ao facto de ocorrer a quebra da ligação da astaxantina com proteínas e a quitina durante a fermentação, tornando a astaxantina mais disponível para extracção. Além disso, a fermentação láctica confere uma maior estabilidade à astaxantina, visto que este processo promove um ambiente redutor com a produção de ácido láctico (Armenta-López *et al.*, 2002a).

Vilasoá-Martínez *et al.* (2008) determinaram por HPLC-UV-Vis a astaxantina no exoesqueleto do caranguejo (*Chionoecetes opilio*), e obtiveram uma concentração de  $17,90 \mu\text{g/g}$  em matéria seca. Este valor é próximo da quantidade de astaxantina obtida no exoesqueleto do lagostim cru ( $22,7 \mu\text{g/g}$ ). Contudo, é de notar que o caranguejo *Chionoecetes opilio* sofreu um processo de secagem prévio e que a extracção foi realizada com solventes orgânicos diferentes dos do presente trabalho.

Gimeno *et al.* (2007) obtiveram uma concentração de astaxantina em amostras de camarão cru liofilizado (cefalotórax) próxima de  $21 \mu\text{g/g}$  em matéria seca por HPLC-DAD, sendo esta concentração inferior às amostras que sofreram um processo de fermentação ( $118 \mu\text{g/g}$ ). A concentração de astaxantina no camarão cru liofilizado foi próxima do lagostim *P. clarkii*, apesar de se tratar de espécies diferentes. No entanto, é de salientar que o camarão sofreu um processo de liofilização e foi extraído com acetona.

Relativamente aos dados reportados sobre a determinação da astaxantina especificamente na matriz em estudo (lagostim *P. clarkii*), os poucos estudos conhecidos apenas têm aplicado a técnica clássica por espectrofotometria UV-Vis (Meyers & Bligh *et al.*, 1981; Meyers & Chen, 1983; Pérez-Gálvez *et al.*, 2008; Cremades *et al.*, 2001).

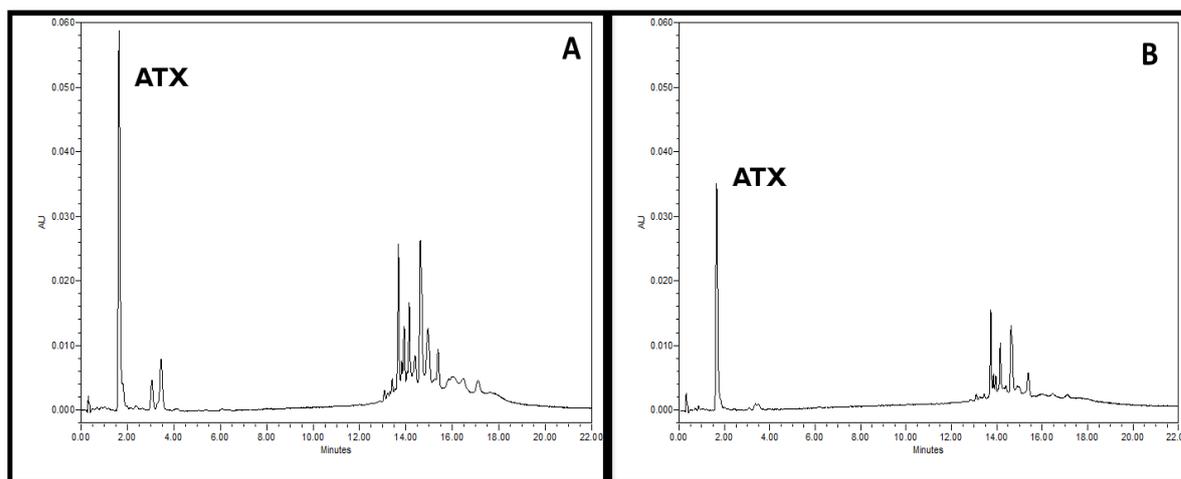
Por exemplo, Meyers & Bligh (1981) usaram uma mistura de solventes polares e apolares (éter de petróleo, acetona e água) para extracção da astaxantina de subprodutos de lagostim *P. clarkii* cozidos (exoesqueleto e cefalotórax) e obtiveram uma concentração de astaxantina de 61 µg/g. Este valor é bastante superior aos valores obtidos, tanto em amostras cruas como cozidas. Esta diferença pode estar associada aos diferentes processos de tratamento e extracção da amostra (Núñez-Gastélum *et al.*, 2011), assim como a diferenças na alimentação que podem ser condicionadas pela diferente disponibilidade de alimento no meio onde se inserem (Ilhéu *et al.*, 1993), sendo que a escolha alimentar do lagostim *P. clarkii* também é afectada pelo seu estágio de crescimento (Correia, 2003) e pelas estações do ano (Correia, 2002).

Outro dos objectivos deste estudo foi verificar a influência da cozedura na libertação da astaxantina.

De acordo com a literatura científica, a astaxantina presente nos crustáceos encontra-se complexada a proteínas (carotenoproteínas) (Higuera-Ciapara *et al.*, 2006), sendo que processos térmicos levam à desnaturação irreversível das proteínas e consequentemente a libertação da astaxantina, originando uma coloração laranja-avermelhada mais intensa nos crustáceos (Meyers & Chen, 1982b; Rodriguez-Amaya, 1999).

Os dados obtidos (Tabela 19) reflectem que o processo de cozedura permitiu aumentar a concentração de astaxantina no exoesqueleto (1,3 vezes mais concentrado), no cefalotórax (1,1 vezes mais concentrado) e no lagostim inteiro (1 vez mais concentrado).

Os cromatogramas da astaxantina apresentados (Figura 23) evidenciam a diferença entre o exoesqueleto cru e o cozido para a mesma quantidade de amostra injectada.



**Figura 23** Picos cromatográficos da astaxantina (ATX) a 480 nm, no exoesqueleto cozido (A) e no exoesqueleto cru (B).

Todavia, nem sempre o processo de cozedura provocou um aumento da concentração de astaxantina, como no caso da parte edível. Além disso, no caso das amostras do exoesqueleto, cefalotórax e do lagostim inteiro, o aumento da concentração da astaxantina foi ligeiramente inferior comparado com os dados de Sanches-Silva *et al.* (2012b). De acordo com Sanches-Silva *et al.* (2012b), a cozedura provocou uma concentração de astaxantina 1,6 vezes maior no exoesqueleto, 1,4 vezes maior no cefalotórax e 1,7 vezes maior na parte edível.

Na quantificação do  $\alpha$ -tocoferol, verificou-se que no caso das amostras cruas o cefalotórax foi o componente com maior concentração (58,6  $\mu\text{g/g}$ ), seguido o exoesqueleto (33,5  $\mu\text{g/g}$ ). O processo de cozedura provocou uma diminuição considerável na quantidade de  $\alpha$ -tocoferol das amostras (Tabela 16), no caso do cefalotórax a concentração foi 3,4 vezes menor, no exoesqueleto 1,4 vezes menor e no lagostim inteiro 1,2 vezes menor.

Apesar de não existirem estudos disponíveis que comparem o efeito da temperatura na degradação do  $\alpha$ -tocoferol em crustáceos, os resultados obtidos estão de acordo com a base de dados nutricional americana (USDA- *United States Nutrient Database for Standard Reference*). Segundo USDA (2013a), a porção edível dos crustáceos (várias espécies) selvagens e crus possuem uma quantidade de  $\alpha$ -tocoferol de 28,5  $\mu\text{g/g}$ , enquanto os cozidos possuem um valor inferior de 15,0  $\mu\text{g/g}$  (USDA, 2013b).

A explicação deste fenómeno deve-se ao facto do  $\alpha$ -tocoferol, na presença de oxigénio, ser instável a elevadas temperaturas. Na ausência de oxigénio, o  $\alpha$ -tocoferol é

capaz de suportar elevadas temperaturas, porém, em condições atmosféricas normais, a taxa de oxidação do composto aumenta, levando à sua degradação (Ferreira, 1985; Bruscatto et al., 2009; Sabliov et al., 2009). Desta forma, a diminuição da concentração do  $\alpha$ -tocoferol nas amostras cozidas foi devido à temperatura de cozedura combinada com a presença de oxigénio.

No que se refere aos valores obtidos de  $\alpha$ -tocoferol no lagostim (Tabela 16) comparativamente com a escassa literatura disponível em crustáceos verificam-se diferenças.

López-Cervantes et al. (2006b) determinou a concentração de  $\alpha$ -tocoferol em camarão fermentado (exoesqueleto e cefalotórax) por HPLC-DAD e obteve uma concentração de 368  $\mu\text{g/g}$  em matéria seca. Enquanto, Vilasoa-Martínez et al. (2008) obteve um teor de 233  $\mu\text{g/g}$  em matéria seca de caranguejo cru (exoesqueleto de *Chionoecetes opilio*) por HPLC-FLD. Sanches-Silva et al. (2010b) também determinaram o teor de  $\alpha$ -tocoferol em amostras de camarão fermentado (extraídas com metanol) por UHPLC-DAD e obtiveram uma concentração de 498  $\mu\text{g/g}$  de  $\alpha$ -tocoferol.

Estas diferenças de valor podem estar associadas pelo facto de se tratar de diferentes espécies, e por apresentarem diferentes processos de tratamento, como é o caso da fermentação, e da saponificação aplicada por López-Cervantes et al. (2006b).

É importante referir, que tendo em conta as características físicas e químicas dos compostos em estudo, durante o tratamento e extracção das amostras poderá ter ocorrido alguma degradação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol. De acordo com Rodriguez-Amaya (1999), uma das fontes típicas de erros em análise de carotenóides são a oxidação durante a etapa extracção, visto que são compostos sensíveis à luz, ao oxigénio e à temperatura.

Sanches-Machado et al. (2002) também referem que o  $\alpha$ -tocoferol pode sofrer perdas como resultado da oxidação, sendo mais notável no contacto com o ar ou no contacto com a luz UV durante a etapa de extracção. O processo de tratamento e extracção aplicado no presente trabalho é simples e rápido e foi desenvolvido em condições de protecção da luz e do oxigénio. Contudo, a preparação e extracção de elevado número de amostras ao mesmo tempo poderá levar a algumas perdas. Etapas como a trituração, pesagem das amostras e filtrações, onde há o contacto directo com o oxigénio, poderão ser factores que levam a algumas perdas dos analitos em estudo.

Desta forma, recomenda-se que em análises futuras, a preparação e extracção seja realizada num pequeno número de amostras ao mesmo tempo. E sugere-se a adição de um

composto antioxidante (por exemplo BHT, ácido ascórbico) de forma a proteger os extractos de fenómenos de oxidação, tal como é documentado por outros autores (Meyers *et al.*, 1982b; Armenta-López *et al.*, 2002b Quirós & Costa, 2006).

## 4. Conclusões e Perspectivas Futuras

### 4.1 Conclusões

Na generalidade, o presente trabalho permitiu valorizar o lagostim invasor *Procambarus clarkii* visto que as metodologias aplicadas permitiram determinar compostos de valor comercial, como a astaxantina e o  $\alpha$ -tocoferol, assim como a capacidade antioxidante da matriz.

Na determinação da capacidade antioxidante *in vitro* através do método dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>, verificou-se que o camarão selvagem foi a amostra com maior actividade antioxidante, seguido do camarão de aquacultura e do lagostim *P. clarkii*. Contudo, pelo método ABTS obteve-se melhores resultados de actividade antioxidante para todos os extractos comparativamente com o método DPPH, sendo uma das possíveis causas a interferência do espectro de absorção dos carotenóides com o do DPPH a 517 nm.

Visto que não existe literatura disponível que permita entender a diferente capacidade antioxidante entre os extractos do camarão e do lagostim, seria necessário determinar, em futuros estudos, os compostos fenólicos totais, assim como, a determinação de aminoácidos em cada extracto de forma a tentar encontrar uma correlação com os valores obtidos de actividade antioxidante.

Contudo, pode-se concluir que o lagostim *P. clarkii* é uma importante fonte de compostos antioxidantes, visto que demonstrou uma expressiva actividade antioxidante através do ensaio ABTS, sendo esta dependente da concentração de extracto utilizado.

Na generalidade o método usado para determinar a astaxantina e o  $\alpha$ -tocoferol demonstrou ser simples, rápido e permitiu uma boa resolução a baixos níveis de detecção. O detector de diodos (DAD) proporcionou uma boa sensibilidade e especificidade, permitindo a respectiva análise dos analitos de interesse. As condições cromatográficas também permitiram uma boa separação e resolução dos analitos. É importante referir que, a tecnologia UHPLC-DAD e a coluna analítica com partículas de tamanho <2  $\mu$ m utilizada nesta dissertação, comparativamente com o HPLC, proporcionaram uma melhor sensibilidade, resolução e velocidade de análise (redução dos tempos de retenção).

Desta forma, o método descrito é rápido, visto que apresentou um tempo de corrida de 22 minutos, com a detecção da astaxantina a um tempo de retenção aproximadamente de 1,8 minutos a 480 nm e o  $\alpha$ -tocoferol a um tempo de retenção na ordem dos 13,2

minutos a 294 nm. É de notar ainda, que não houve interferentes da matriz nem a presença de compostos que pudessem comprometer a identificação inequívoca dos analitos em estudo, mostrando-se um método selectivo.

A curva de calibração da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol apresentaram coeficientes de determinação de 0,9991 e 0,9994, respectivamente, com um bom ajuste linear para as gamas de trabalho propostas para cada analito.

O método também apresentou bons limites de quantificação, nomeadamente, de 0,05  $\mu\text{g/mL}$  para a astaxantina e de 0,6  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\alpha$ -tocoferol.

No estudo da validação, foi ainda possível verificar se o presente método possibilita a obtenção de resultados repetíveis para ambos os compostos. No caso da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol obteve-se na precisão intra-dia valores de RSD (%)  $\leq 5\%$  para os diferentes componentes do lagostim (cru e cozido) para um número de 3 repetições para cada amostra. No caso do  $\alpha$ -tocoferol, cumpriu-se um RSD (%)  $\leq 10$  na precisão inter-dia ( $n=9$ ) nas amostras cruas.

O processo de extracção aplicado apresentou bons resultados de recuperação da astaxantina nos níveis de concentração estudados (3,7; 9,2 e 20  $\mu\text{g}$ ), obtendo valores de recuperação de  $97\% \pm 6\%$  no exoesqueleto cozido,  $99\% \pm 7\%$  no cefalotórax cozido e de  $89\% \pm 7,2\%$  no lagostim inteiro.

Em ambos os tipos de amostra (cru e cozido), o exoesqueleto obteve a concentração de astaxantina mais elevada, seguindo-se o cefalotórax e a parte edível. As amostras de exoesqueleto cozidas evidenciaram uma coloração mais intensa e um aumento da concentração de astaxantina ( $30,5 \pm 1,2 \mu\text{g/g}$ ), pois o aumento da temperatura provoca a desnaturação das carotenoproteínas levando à libertação da astaxantina. Na generalidade, os resultados obtidos foram concordantes com os dados reportados da literatura.

Relativamente ao  $\alpha$ -tocoferol, o cefalotórax foi o componente com maior concentração ( $58,6 \pm 2,7 \mu\text{g/g}$ ). Sendo que, o processo de cozedura provocou uma diminuição considerável na concentração de  $\alpha$ -tocoferol nas amostras, nomeadamente, de 1,2 a 3,4 vezes menor. A temperatura de cozedura combinada com a presença de oxigénio são as causas da degradação do analito.

Pode-se concluir que, tendo em conta os resultados obtidos, a metodologia aplicada permitiu a determinação da astaxantina e do  $\alpha$ -tocoferol no lagostim *P. clarkii*. Devido a factores como o tempo e a disponibilidade de equipamento não foi possível a realização de

um maior número de ensaios que permitissem a validação completa do método aplicado. Desta forma, os resultados apresentados nesta dissertação têm de ser considerados preliminares.

Com o presente estudo de valorização e caracterização do lagostim invasor *P. clarkii*, é possível afirmar que esta matriz é uma fonte rica em astaxantina natural e  $\alpha$ -tocoferol. Tendo em conta o elevado custo da astaxantina sintética e a crescente procura por fontes naturais de astaxantina, esta matriz poderá ser promissora e competir com o mercado da astaxantina sintética aplicada na aquacultura, assim como, competir com outras fontes naturais, como a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma*, cujos respectivos processos de produção são bastante dispendiosos.

É de salientar, ainda, que em Portugal esta matriz não é apreciada e explorada gastronomicamente, ao contrário do que acontece no Louisiana (EUA), o que permite a utilização deste crustáceo invasor por inteiro, ou seja, não se limita apenas à utilização dos seus subprodutos.

## 4.2 Perspectivas Futuras

- Primordialmente, tendo por base o estudo já desenvolvido, seria crucial a continuação de estudos ao nível da validação, nomeadamente dos parâmetros de precisão (repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade).
- Seria importante analisar as diferenças na quantidade de astaxantina entre os indivíduos juvenis e os indivíduos adultos, assim como a diferença entre duas estações do ano (ex: Verão e Inverno), visto que segundo a literatura a escolha alimentar destes crustáceos é afectada pelo estágio de crescimento e as estações do ano (Correia, 2002; Correia, 2003).
- Tendo em conta que grande parte da astaxantina presente nos crustáceos encontra-se esterificada (Higuera-Ciajara *et al.*, 2006), seria importante quantificar o teor de astaxantina monoéster e diéster, pois no presente estudo apenas foi determinada a astaxantina livre.
- Seria importante analisar se a adição de sal na cozedura do lagostim, tem influência na libertação da astaxantina complexada a proteínas. O motivo desta sugestão deve-se ao facto no estudo de Sanches-Silva *et al.* (2012b) os camarões adquiridos comercialmente terem sido cozidos com adição de sal e de se ter obtido uma maior concentração de astaxantina comparativamente com o presente estudo, cujo processo de cozedura foi realizado sem sal.

- Testar o processo de fermentação em amostras de lagostim de forma a verificar a sua influência no teor de astaxantina, como é aplicado por vários autores em amostras de camarão (López-Cervantes *et al.*, 2006a; Sanches-Silva *et al.*, 2012b). Além disso, visto que este processo permite a separação da fracção rica em proteínas, fracção lipídica (astaxantina) e a fracção sólida (quitina), seria de elevado interesse determinar o teor de quitina e de proteínas/aminoácidos presentes em cada fracção.
- Por fim, por questões de segurança alimentar e das possíveis aplicações futuras da astaxantina desta matriz, seria de extrema importância também fazer um levantamento dos pesticidas utilizados nos campos de arroz na zona do Baixo Mondego, e proceder a análises dos mesmos em amostras de lagostim *P. clarkii*.

## 5. Referências Bibliográficas

Almeida, C. & Bronze, M. - **Validação de metodologias analíticas**. Cadernos de Formação da Ordem dos Farmacêuticos: Ordem dos Farmacêuticos. Research Opportunities Forum. (2005), 1-34.

Anastácio, P. M., Frias, A. F & Marques, J.C. - **Impact of crayfish densities on wet seeded rice and the inefficiency of a non-ionic surfactant as an ecotechnological solution**. Ecological Engineering. 15 (2000): 17–25.

Anastácio, P. M. - **An Ecotechnological approach to crayfish and rice production**. Coimbra: Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 1997. Tese de Doutoramento.

Anastácio, P. M. - **Ciclo Biológico e Produção do Lagostim vermelho da Louisiana (*Procambarus clarkii*, Girard) na Região do Baixo Mondego**. Coimbra, Universidade de Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologias, 1993. Tese de Mestrado.

Antolovich, M., Prenzler, Patsalides, E. - **Methods for testing antioxidant activity**. *The Analyst*. 127 (2002), 183-198.

Aoun, E., Rima, J., Chidiac, G. & Hanna, K. - **High-performance liquid chromatographic and spectrofluorometric determination of  $\alpha$ -tocopherol in a natural plant: *Ferula hermonis* (*Zaloo* root)**. Journal of Food Composition and Analysis. 18 (2005), 607–615.

Arbia, W., Arbia, W., Adourt, L. & Amrane, A. - **Chitin Extraction from Crustacean Shells by Biological Methods – A review**. Université européenne de Bretagne, France, 2012.

Armenta-López, R., Guerrero-Lagarreta, I. & Huerta, S. – **Extracción de caroproteínas a partir de residuos de camarón fermentados**. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 1 (2002b), 49-55.

Armenta-López, R., Guerrero, I. & Huerta, S. - **Astaxanthin Extraction From Shrimp Waste by Lactic Fermentation and Enzymatic Hydrolysis of the Carotenoprotein Complex**. Journal of Food Science. 67 (2002a), 1002–1006.

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica. Portugal: act. 2013-5-28. [Consul. 28 Mai. 2013]. Disponível na internet: <http://www.asae.pt/>.

Astareal – Astareal, Be you, just healthier. Suécia: astareal AB, actualizado 2012. [Consul. 28 Mai. 2013]. Disponível na internet: < <http://www.bioreal.se/index.php?Page=1&id=5>>.

Augustini, Paula Rossini - **Efeito dos carotenóides licopeno e astaxantina sobre danos renais induzidos por cloreto de mercúrio**. Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exactas, 2007. Tese de Mestrado.

Babu, C., Rupsankar, C., Sambasivarao, S. & Raja, K. - **Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids.** Food Science and Technology. 41 (2008), 227-235.

Barim, O., Beytut, E. & Kamiloglu, N. - **The Effect of Different Levels of Vitamin E in the Diet on vitamins A, E and  $\beta$ -carotene Concentrations in the Tissues of Mature Freshwater Crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823).** Turkish Journal of Science & Technology. 6, 1 (2011), 25-33.

Barim, Ozden – **The Effects of Dietary Vitamin E on the Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activities in Their Tissues and Ovarian Egg Numbers of Freshwater Crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823).** Journal of Animal and Veterinary Advances. 8, 6 (2009), 1190-1197.

Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M. & Kishimura, H. - **Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).** Food Chemistry. 106 (2008), 185–193.

Bowen, J., Soutari, C., Serwata, R., Lagocki, S., White, D., Davies, S & Young, A. - **Utilization of astaxanthin acyl esters in pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquaculture Nutrition. 8 (2002), 59-68.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. & Berset, C. - **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.** LWT - Food Science and Technology. 28, 1 (1995), 25–30.

Britton, G. - **General carotenoid methods.** Methods Enzymology. 111 (1985), 111-113.

Bruscatto, M., Zambiazzi, R., Sganzerla, M., Pestana, V. & Otero, D. - **Degradation of Tocopherols in Rice Bran Oil Submitted to Heating at Different Temperatures.** Journal of Chromatographic Science. 47 (2009), 736-765.

Calo, P., Velasquez, J., Sieiro, C., Blanco, P., Longo, E & Villa, T. - **Analysis of astaxanthin and other carotenoids from several *Phaffia rhodozyma* mutants.** Journal Agriculture and Food Chemistry. 43, 5 (1995), 1396–1399

Camera, E., Mastrofrancesco, A., Fabbri, C., Daubrawa, F., Picardo, M., Sies, H. & Stahl, W. - **Astaxanthin, canthaxanthin and  $\beta$ -carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress responsive enzymes.** Experimental Dermatology. 18 (2009), 222–231.

Careri, M., Elviri, L. & Mangia, A. - **Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of  $\beta$ -carotene and xanthophylls: validation of the analytical method.** Journal of Chromatography. 854 (1999), 233–244.

Carranco, M., Calvo, C., Arellano, L., Gil, F., Ávila, E. & Fuente, B. – **Inclusión de la harina de cabezas de camarón *Penaeus sp.* en raciones para gallinas ponedoras. Efecto**

sobre la concentración de pigmento rojo de yema y calidad de huevo. *Interciencia*. 28, 6 (2003), 328-333.

Carreira, Bruno Martins - **Impactos de *Procambarus clarkii* na comunidade de macrófitas de charcos temporários mediterrânicos – uma abordagem experimental**. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2010. Tese de Mestrado.

Castelo-Branco, V. & Torres, A. - **Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos**. *Revista de Nutrição*. 24,1 (2011), 173-187.

Cavalheiro, R., Rorig, L., Fontana, J. & Pessatti, M. – **Testes preliminares de crescimento com uma cepa da microalga produtora de astaxantina *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales)**. *Notas Técnicas da Fácimar*. 3 (1999), 73-77.

Charest, D., Balaban, M., Marshall, M. & Cornell, J. - **Astaxanthin extraction from crawfish shells by supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol as cosolvent**. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 3 (2001), 81–96.

Chen, C., Wu, S., Wu, Y., Fang, J. & Wu, T. - **Properties of astaxanthin/Ca<sup>2+</sup> complex formation in the deceleration of cis/trans isomerization**. *Organic Letters*. 9, 16 (2007), 2985–2988.

Cheung, L., Cheung, I. & Li-Chan, E. - **Effects of Production Factors and Egg-Bearing Period on the Antioxidant Activity of Enzymatic Hydrolysates from Shrimp (*Pandalopsis dispar*) Processing Byproducts**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (2012), 6823–6831.

Chociai, M., Machado, I., Fontana, J., Chociai, J., Busato, S. & Bonfim, T. - **Cultivo da levedura *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) em processo descontínuo alimentado para produção de astaxantina**. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*. 38 (2002), 457-462.

Coral-Hinostroza, G. & Bjerkgeng, B. – **Astaxanthin from red crab lagostilla (*Pleuroncodes planipes*): optical RyS isomers and fatty acid moieties of astaxanthin esters**. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 133, (2002), 437-444.

Correia, A. M. - **Food Choice by the introduced crayfish *Procambarus clarkii***. *Annales Zoologici Fennici*. 40 (2003), 517-528.

Correia, A. M. - **Niche breadth and trophic diversity: feeding behaviour of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) towards environmental availability of aquatic macroinvertebrates in a rice field (Portugal)**. *Acta Oecologica*. 23 (2002), 421–429.

Cort, A., Ozturk, N., Akpinar, D., Unal, M., Yucel, G. & Ciftcioglu, A. - **Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 58 (2010), 121–130.

Cremades, O., Parrado, J., Alvarez-Ossorio, M., Jover, M., Terán, L., Guitiérrez, J. & Bautista, J.- **Isolation and characterization of carotenoproteins from crayfish (*Procambarus clarkii*).** *Food Chemistry*. 82 (2003), 559–566.

Cremades, O., Ponce, E., Corpas., R., Guitiérrez, F., Jover, M., Alvarez-Ossorio, M., Parrado, J. & Bautista, J. - **Processing of Crawfish (*Procambarus clarkii*) for the Preparation of Carotenoproteins and Chitin.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (2001), 5468-5472.

Cunha, Sara Cristina – **Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas.** Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2007. Tese de Doutoramento.

Cysewski, Gerald - **Natural Astaxanthin: King of the Carotenoids.** 2ª Ed. USA: Cyanotech Corporation, 2008. ISBN-10: 0-9792353-0-8.

Cysewsky, G. & Lorez, R. - **Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin.** *Trends in Biotechnology*. 18 (2000), 160-167.

Decreto-Lei n.º 565/99 de 21 de Dezembro. **Regula a introdução na Natureza de espécies não indígenas da flora e da fauna.** Diário da República n.º 295 - I Série-A. Ministério do Ambiente, Lisboa.

Delgado-Vargas, F. & Paredes-Lopez, O. - **Natural colorants for food and nutraceutical uses.** 1ª Ed. Florida : CRC Press, 2003. ISBN 1-58716-076-5.

Deshpande, S. & Salunke, D. - **Nutritional and health aspects of food antioxidants. In: Food antioxidants. Technical, toxicological and health perspectives.** New York, NY: Marcel Dekker Publishers, 1996.

Domínguez-Bocanegra, A., Guerrero Legarreta, I., Martínez Jeronimo, F. & Tomasini Campocoso, A. - **Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*.** *Bioresource Technology*. 92 (2004), 209– 214.

Duarte-Almeida, M., Santos, R., Genovese, M. & Lajolo, F. – **Avaliação da actividade antioxidante utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26, 2 (2006), 446-452.

EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request from the European Commission on the safety of use of colouring agents in animal nutrition: Part I. General Principles and Astaxanthin (Question No. EFSA-2003-060). *The EFSA Journal* 291, (2005), 1-40.

EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal feed on environmental impact of astaxanthin-rich *Phaffia rhodozyma* (Ectone®) as feed additive in accordance with Council Directive 70/524/ECC (Question No. EFSA-Q-2003-112). The EFSA Journal. 43 (2004), 1-4.

El-Kholie, E., Khader, S. & Abdelreheem, M. - **Chemical, physical, microbiological and quality attributes studies on River Nile crayfish**. African Journal of Biotechnology. 11,51, (2012), 11262-11270.

Elmossalami, M. & Eman, M. - **Safety and quality of fresh water crayfish *Procambarus clarkii* in the river Nile**. Nahrung. 43, 2 (1999), 126–128.

Fang, Y., Yang, S. & Wu, G. - **Free radicals, antioxidants and nutrition**. Nutrition. 18 (2002), 872-879.

Fassett, R. & Combes, J. - **Astaxanthin, Oxidative Stress, Inflammation and Cardiovascular disease**. Future cardiology. 5, 4 (2009), 333-342.

FDA, 2011 – Code of Federal Regulations (CFR). Title 21: Food and Drugs. Chapter I- Food and Drugs Administration, Department of Health and Human Services, Part 73 – Listing of Color Additives Exempt from Certification (21 CFR73.35). Office of Federal Register: Washington, DC (revised April 2011).

Felix-Valenzuela, I., Higuera-Ciajara, F. & Goycoolea-Valencia, W. - **Supercritical CO<sub>2</sub>/ethanol extraction of astaxanthin from blue crab (*Callinectes sapidus*) shell waste**. *Journal of Food Process Engineering*. 24 (2001), 101–112.

Ferreira, F. A. Gonçalves – **Nutrição Humana**. Lisboa: Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, 1985.

Ferreira, I. & Abreu, R. - **Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos**. Bioanálise. IV, 2 (2007), 32-39.

Ferreira, I., Barros, L. & Abreu, R. - **Antioxidants in wild mushrooms**. Current Medicinal Chemistry. 16 (2009), 1543-1560.

Food and Drug Administration and Center for Drug Evaluation and Research. - **Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods**. Rockville, MD: US FDA Federal Register, 1994.

Geiger, W., Alcorlo, P., Baltanás, A. & Montes, C. - **Impact of an introduced Crustacean on the trophic webs of Mediterranean wetlands**. Biological Invasions. 7 (2005), 49–73.

Gherardi, F., Barbaresi, S. - **The invasion of the alien crayfish *Procambarus clarkii* in Europe, with particular reference to Italy**. Biological Invasions. 2 (2000), 259-264.

- Ghiggi, Vanessa – **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. Curitiba, Brasil: Universidade Federal do Paraná, UFPR sector de tecnologia, 2007. Tese de Mestrado.
- Gross, J. - **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. 1ª Ed. New York: Published by Van Nostrand Reinhold, 1991. ISBN 04-420-06578.
- Guerin, M., Huntley, M. & Olaizola, M. - ***Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition***. Trends in Biotechnology. 21, 5, (2003), 210-216.
- Guillou, A., Khalil, M & Adambounoub, L - **Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste**. Aquaculture. 130 (1995), 351-360.
- Gimeno, M., Ramírez-Hernandez, J., Martínez-Ibarra, C., García-Arrazola, R., Bárzana, E. & Shirai, K. - **One-Solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 55 (2007), 10345–10350.
- Guinaz, M., Milagres, R., Pinheiro-Santana, H. & Chaves, J. - **Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos**. Química Nova. 32, 8, (2009).
- Gutiérrez-Yurrita, P., Sancho, G., Bravo, M., Baltanás, A. & Montes, C - **Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in natural ecosystems of the Doñana National Park temporary fresh-water marsh (Spain)**. Journal of Crustacean Biology. 18, 1 (1998), 120–127.
- Hamdi, S. - **Muscle and exoskeleton extracts analysis of both fresh and marine crustaceans *Procambarus clarkii* and *Erugosquilla massavensis***. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 5, 13 (2011), 1589-1597.
- Hata, N., Ogbonna, C., Hasegawa, Y., Taroda, H & Tanaka, H. - **Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophicphotoautotrophic culture**. Journal of Applied Phycology. 13, (2001), 395–402.
- He, H., Chen, X., Sun, C., Zhang, Y., & Gao, P. - **Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus sp.*** Bioresource Technology. 97 (2006), 385–390.
- Heinonen, O., Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P., Huttunen, J., Hartman, A. *et al.* - **Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial**. Journal of the National Cancer Institute. 18, 90 (1998), 440-6.
- Henriques, João Filipe - **Contaminação de cadeias tróficas em zonas húmidas: Implicações para a conservação**. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2010. Tese de mestrado.

- Herrera-Andrade, M., Sánchez-Machado, D., López-Cervantes, J., Núñez-Gastélum, J. & Moreno-Ramos, O. – **Extracción de la astaxantina y su estabilidad**. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 7,1 (2011), 21-27.
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. & Goycoolea, M. - **Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 46, (2006), 185–196.
- Higuera-Ciapara, I., Felix-Valenzuela, L., Goycoolea F. & Arguellez-Monal, W. - **Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix**. Carbohydrate Polymers. 56, 1 (2004), 41-45.
- Horn, A., Buckup, L., Noro, C. & Barcelos, D. - **Morfologia externa de *Parastacus brasiliensis* (Decapoda, Parastacidae)**. Iheringia. Série Zoologia. 98, 1 (2008), 148-155.
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R. -**The chemistry behind antioxidant capacity assays**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (2005), 1841–1856.
- Huck, C., Popp, M., Scherz, H. & Bonn, G. - **Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLCMS- MS**. Journal of Chromatographic Science. 38 (2000), 441–449.
- Ilhéu, M., Acquistapace, P., Benvenuto C. & Gherardi, F. - **Shelter use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) in dry-season stream pools**. Arch. Hydrobiology. 154, 4 (2003), 535-546.
- Ilhéu, M., Bernardo, J. - **Aspects of trophic ecology of Louisiana red swamp crayfish (*Procambarus clarkii* Girard) in Alentejo, South of Portugal**. In: VI Congresso Español de Limnología, Granada 9-13 Sept. 1991.
- Internacional Conference on Harmonization (ICH) - **Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Rockville, MD: US FDA Federal Register, 1996.
- Johnson, E. - ***Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey**. International Microbiology. 6, 3 (2003), 169-174.
- Johnson, E. & An, G. - **Astaxanthin from microbial sources**. Critical Reviews in Biotechnology. 11, 4, (1991), 297-326.
- Johnson, E., Villa, T. & Lewis, M. - ***Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets**. Aquaculture. 20 (1980), 123–134.
- Kalinowski, T., Izquierdo M., Schuchardt, D. & Robaina, L. - **Dietary supplementation time with shrimp shell meal on red porgy (*Pagrus pagrus*) skin colour and carotenoid concentration**. Aquaculture. 272 (2007), 451-457.

- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. - **The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols**. *Lipids*. 31, 7 (1996), 671-701.
- Kazakevich, Y. & LoBrutto, R. - **HPLC for pharmaceutical scientists**. New Jersey: John Wiley-Interscience: 2007.
- Kim, S. & Mendis, E. - **Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review**. *Food Research International*. 39 (2006), 383–393.
- Kittikaiwan, P., Powthongsook, S., Pavasant, P. & Shotipruk, A. - **Encapsulation of Haematococcus pluvialis using chitosan for astaxanthin stability enhancement**. *Carbohydrate Polymers*. 70 (2007), 378–385.
- Korn, M., Pereira, M. & Borges, S. - **Algumas Aplicações Analíticas dos Ultra-sons**. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*. 96 (2005), 51-56.
- Kurashige, M., Okimasu, M. & And, K. - **Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin**. *Physiological Chemistry & Physics & Medical*. 22, 1 (1991), 2- 38.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A. & Mancini-Filho, J. – **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 25, 4 (2005), 726-732.
- Lacker, T., Strohscheinb, S. & Alberta, K. - **Separation and identification of various carotenoids by C30 reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection**. *Journal of Chromatography*. 854 (1999), 37–44.
- Lago, M., Quirós, A., Sendón, R., Sanches-Silva, A., Costa, H., Sánchez- Machado, D., López-Cervantes, J., Valdez, H., Aurrekoetxea, G., Angulo, I. & Losada, P. - **Compilation of analytical methods to characterize and determine chitosan, and main applications of the polymer in food active packaging Recopilación de métodos analíticos para la caracterización y determinación del quitosano y las principales aplicaciones del polímero en los envases activos alimentarios**. *Cyta - Journal of Food*. 9, 4, (2011), 319-328.
- Leitão, Pedro Henrique - **Existem limites para a dispersão e colonização de novos habitats pelo lagostim americano *Procambarus clarkii***. Lisboa: Universidade de Lisboa, 2009. Tese de Mestrado.
- Li, H. & Chen, F. – **Preparative isolation and purification of astaxanthin from microalga *Chlorococcum* sp. by high-speed counter-current chromatography**. *Journal of Chromatography A*. 925 (2001), 133-137.
- Li, H., Tyndale, S., Heath, D. & Letcher, R. - **Determination of carotenoids and all-trans-retinol in fish eggs by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry**. *Journal of chromatography B*. 28, 816 (2005), 49-56.

- Lignell, A., Nicolin, C., Larsson, H. & Inbor, J. (1998) - **Method for increasing the production of/in breeding and production animals in the poultry industry**, United States Patent #5744502.
- Lin, T., Lu, C. & Wang, S. - **Astaxanthin inhibits glutamate release in rat cerebral cortex nerve terminals via suppression of voltage-dependent Ca<sup>(+2)</sup> entry and mitogen-activated protein kinase signaling pathway**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 58 (2010), 8271-8278.
- Lin, W., Chien, J. & Chen, B. – **Determination of carotenoids in spear shrimp shells (*Parapenaeopsis hardwickii*) by liquid chromatography**. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (2005), 5144-5149.
- López, M., Arce, L., Garrido, J., Rios, A. & Valcárcel, M. – **Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide**. Talanta. 64 (2004), 726-731.
- López-Cervantes, J., Adan-Bante, N. & Sánchez-Machado, D. - **Separation and biochemical characterization of the products from fermented shrimp wastes**. Transworld Research Network. 37, 2 (2010), 1-16. ISBN: 978-81-7895-485-1.
- López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D. & Ríos-Vázquez, N. - **High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol,  $\alpha$ -tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate**. Journal of Chromatography A. 1105 (2006b), 135–139.
- López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D., Gutiérrez-Coronado, M. & Rios-Vázquez, J. – **Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC**. Biomedical Chromatography. 20, (2006a), 981-984.
- Luna-Rodríguez, A., Medina-Reyna, C., Pedroza-Islas, R. & Durán-de-Bazúa, C. - **Oleous Extraction of Carotenoids from Shrimp Cephalothorax and its Effect on a Microencapsulated Diet with Nauplii Larvae**. Journal of Aquatic Food Product Technology. 17, 4 (2008), 367-386.
- Magalhães, Ana Sofia – **Estudo do Efeito Protector *Cydonia Oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos**. Porto, Universidade Fernando Pessoa, Faculdade das Ciências da Saúde, 2009. Tese de Licenciatura em Ciências Farmacêuticas.
- Maldaner, L. & Jardim, I. - **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência**. Química Nova. 32, 1 (2009), 214-222.
- Markom, M., Hasan, M., Daud, W., Singh, H. & Jahim, J. - **Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn: Effects of solvents and extraction methods**. Separation and Purification Technology. 52 (2007), 487-496.

Martins, M., Balcão, M., Nunes, A. - **Caracterização e Valorização do lagostim *Procambarus clarkii***. Revista da Faculdade de Ciências e Tecnologias. Porto: Edições Fernando Pessoa. ISSN 1646-0499 (2009), 110-122.

Mendes, Raquel da Conceição – **Resposta da comunidade de carnívoros à invasão recente dos sistemas ribeirinhos do NO de Portugal por lagostim-americano (*Procambarus clarkii*)**. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2011. Tese de Mestrado.

Mendes-Pinto, M., Choubert, G. & Morais, R. - **Effect of dietary bile extracts on serum response of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a preliminary study**. Aquaculture Nutrition. 10, 6, (2004), 353-357.

Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. & Kim, S. - **Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptide for their *in vitro* antioxidant effects**. Life Science. 77 (2005), 2166–2178.

Mera Pharmaceuticals - **A human safety trial of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* algae, produced with Mera Pharmaceuticals proprietary technology**. Confidential Report: RD.0100.001 (1999).

Meyers, S. & Bligh, D. - **Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 29, 3 (1981), 505-508.

Meyers, S. & Chen, H. - **Effect of Antioxidants on Stability of Astaxanthin Pigment in Crawfish Waste and Oil Extract**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 30, (1982a), 469-473.

Meyers, S. & Chen, H. - **Ensilage Treatment of Crawfish Waste for Improvement of Astaxanthin Pigment Extraction**. Journal of Food Science. 48, (1983), 1516-1520.

Meyers, S. & Chen, H. - **Extraction of Astaxanthin Pigment from Crawfish Waste Using a Soy Oil Process**. Journal of Food Science. 47 (1982b), 892-896 e 900.

Meyers, S. P. - **An integrated approach to recovery and utilization of Louisiana crawfish processing wastes**. In: Internacional By-Products Conference, Anchorage, Alaska: 1990.

Meyers, S. P. - **Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas**. In: Memorias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, IV, La Paz, B.C.S., México. Avances en Nutrición Acuícola: 2000.

Mezzomo, Natália- **Extracção de encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão**. Brasil, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012. Tese de Doutorado.

- Mohamed, M., Naglaa, G., Khadiga, S. & Eman, M. – **Chemical composition of freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*) and its nutritive value**. Egyptian Journal of Aquatic Research. 4 (2000), 19-34.
- Molyneux, P. - **The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 26 (2004), 211–219.
- Monroy-Ruiz, J., Sevilla, M., Carrón, R. & Montero, M. - **Astaxanthin-enriched diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats**. Pharmacological Research. 63 (2011), 44–50.
- Moreira, Francisco Dias - **Propagação de um invasor: passado, presente e futuro de *P. clarkii* no noroeste de Portugal**. Lisboa, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2011. Tese de Mestrado.
- Moriel, Danilo Gomes – **Otimização da produção de biomassa e astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma*, utilizando processo descontínuo alimentado**. Curitiba, Brasil: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, 2004. Tese de Mestrado.
- Naguib, Yousry - **Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 48, (2000), 1150–1154.
- Norma Portuguesa (NP) 1088:1982 (2ª Ed.) – **Leites em pó**. Determinação da humidade.
- Norma Portuguesa (NP) 1614:2002 (2ª Ed.) – **Carnes e produtos cárneos. Determinação do teor de humidade**. Método de referência.
- Nunes, Ana Luísa - **Predator-Prey interactions between an invasive crayfish predator and native anurans: Ecological and evolutionary outcomes**. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2011. Tese de Doutoramento.
- Núñez-Gastélum, J., Sánchez-Machado, D., López-Cervantes, J., Paseiro-Losada, P., Sendón, R., Sanches-Silva, A., Costa, H., Aurrekoetxea, G., Angulo, I. & Soto-Valdez, H. – **Evaluación físico-química de aceite pigmentado obtenido de cabeza de camarón**. Grasas y Aceites. 62, 3 (2011), 321-327.
- Ogawa, M., Maia, E., Maia, E., Fernandes, A., Nunes, M., Oliveira, M. & Freitas, S. - **Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenóides**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 27, 2 (2000), 333-337.
- Okada, S., Nur-E-Borhan, S. & Yamaguchi, K. - **Carotenoid composition in the exoskeleton of commercial black tiger prawns**. Fisheries Science. 60 (1994), 213–215.
- Oliver, J. & Palou, A. - **Chromatographic determination of carotenoids in foods**. Journal of Chromatography A. 881 (2000), 543–555.

- Palace, V. & Werner, J. - **Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review**. *Scientia Marina*. 70 (2006), 41-57.
- Pashkow, F., Watumull, D. & Campbell, C. - **Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease**. *American Journal of Cardiology*. 101 (2008), 58D-68D.
- Passos, R., Beirão, L., Palavra, A., Mendes, R., Nobre, B. & Gouveia, L. - **Astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma***. Supercritical carbon dioxide and organic solvents extraction. *Journal of Food Technology*. 4, 1 (2006), 59-63.
- Perdigão, N., Vasconcelos, F., Cintra, I. & Ogawa, M. - **Extração de carotenóides de carapaças de crustáceos em óleo**. *Boletim Técnico Científico da CEPENE*. 3, 1 (1995), 234-246.
- Pérez-Gálvez, J., Negro-Balmaseda, J., Mínguez-Mosquera, M., Cascajo-Almenara, M. & Garrido-Fernández, J. - **Astaxanthin from crayfish (*Procambarus clarkii*) as a pigmentary ingredient in the feed of laying hens**. *Grasas y Aceites*. 59, 2 (2008), 139-145.
- Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. - **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays**. *Food Research International*. 39, 7 (2006), 791-800.
- Pinto, Rute., Patrício, Joana., Salas, Fuensanta., Neto, João & Marques, João – **Bacia do Mondego (capítulo 15). Ecosistemas e Bem-Estar Humano: Resultados da Avaliação para Portugal do Millennium Ecosystem Assessment**, Portugal: Escolar Editora, 2009. P. 513-557.
- Prior, R., Wu, X. & Schaich, K. - **Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53 (2005), 4290-4302.
- Pu, J., Bechtel, P. & Sathivel, S. - **Extraction of shrimp astaxanthin with flaxseed oil: Effects on lipid oxidation and astaxanthin degradation rates**. *Biosystems engineering*. 107 (2010b), 363-371.
- Pu, Jianing – **Development of stable microencapsulated astaxanthin powders using extracted astaxanthin from crawfish and shrimp byproducts**. Louisiana: Faculty of the Louisiana State University, The Department of Food Science, 2010a. Tese de Mestrado.
- Quirós, A. & Costa, H. S. - **Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review**. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 97 (2006), 97-111.
- Rao, R., Alvi, N. & Rao, B. - **Preparative isolation and characterization of some minor impurities of astaxanthin by high-performance liquid chromatography**. *Journal of Chromatography A*. 1076 (2005), 189-192.

- Ramirez, J., Gutierrez, H. & Gschaedler, A. - **Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through factorial design and response surface methodology**. Journal of Biotechnology. 8 (2001), 259–268.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. – **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay**. Free Radical Biology & Medicine. 26 (1999), 1231–1237.
- Refsgaard, H., Brockhoff, P. & Jensen, B. - **Biological Variation of Lipid Constituents and Distribution of Tocopherols and Astaxanthin in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*)**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 46, 3 (1998), 808–812.
- Regulamento (CE) 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de Outubro de 2004 relativo aos materiais e objectos destinados a entrar em contacto com os alimentos. Jornal Oficial da União Europeia. L388/4 13 (13-11-2004).
- Regulation (EC) 1288/2004 of 14 July 2004 concerning the permanent authorization of certain additives and the provisional authorisation of a new use of additive already authorized in feedingstuffs. Official Journal of the European Union. L243/10 (15-7-2004).
- Regulation (EC) 828/2007 of 13 July 2007 concerning the permanent and provisional authorization of certain additives in feedingstuffs. Official Journal of the European Union. L184/12 (14-7-2007).
- Reverchon, E. & De Marco, I. - **Supercritical fluid extration and fractionation of natural matter**. Journal of Supercritical Fluids. 38 (2006), 146-166.
- Ribani, M., Bottoli, G., Collins, C., Melo, L. & Jardim, I. – **Validação de métodos cromatográficos e electroforéticos**. Química Nova. 27, 5 (2004), 771-780.
- Rodriguez-Amaya, Delia – **Carotenoides y Preparacion de alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados**. Procesados y Almacenados. 1ª Ed. Washington: OMN Project, 1999.
- Rodriguez-Amaya, Delia - **Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids: A review**. Journal of Food Composition and Analysis. 23 (2010), 726–740.
- Róldan, P. & Mach, N. – **Efecto del consumo de astaxantina en la salud**. Revista Española de Nutrición Comunitaria. 18, 3 (2012), 164-177.
- Sabliov, C., Fronczek, C., Astete, C., Khachatryan, M. & Leonardi, C. -**Effects of Temperature and UV Light on Degradation of  $\alpha$ -Tocopherol in Free and Dissolved Form**. Journal of the American Oil Chemists' Society. 86, 9 (2009), 895-902.
- Sachindra, N. & Bhaskar, N. - ***In vitro* antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste**. Bioresource Technology. 99 (2008), 9013–9016.

- Sachindra, N. & Mahendrakar, N. - **Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils**. *Bioresource Technology*. 96 (2005b), 1195–1200.
- Sachindra, N., Bhaskar, N. & Mahendrakar, N. - **Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents**. *Waste Management*. 26 (2006), 1092–1098.
- Sachindra, N., Bhaskar, N. & Mahendrakar, N. - **Carotenoids in different body components of Indian shrimps**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 8 (2005a), 167–172.
- Sachindra, N., Bhaskar, N., Siddegowda, G., Sathisha, A. & Suresh, P. - **Recovery of carotenoids from ensilaged shrimp waste**. *Bioresource Technology*. 98 (2007), 1642–1646.
- Sanches-Silva, A., Albuquerque, T., Finglas, P., Ribeiro, T., Valente, A. *et al.* - **Carotenoids, vitamins (A, B2, C and E) and total folate of traditional foods from Black Sea Area countries**. *Journal Science of Food and Agriculture*. (2013), 1-13.
- Sanches-Silva, A., Bueno-Solano, C., Sedón, R., Sánchez-Machado, C. *et al.* - **Determination of  $\alpha$ -tocopherol in shrimp waste to evaluate its potential to produce active packaging**. *Italian Journal of Food Science*. (2010b), 138-141.
- Sanches-Silva, A., Costa, H., Losada, P., Sendón, R., Sánchez-Machado, D., Valdez, H., Varona, I. & López-Cervantes, J. - **Preparation of active packaging with antioxidant and antimicrobial activity based on astaxanthin and chitosan**. *Nutrition Bulletin*. 35 (2010a), 268–271.
- Sanches-Silva, A., Ribeiro, T., Albuquerque, T., Paseiro, P., Sendón, R., Quirós, A., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D., Valdez, H., Angulo, I., Aurrekoetxea, G. & Costa, H. - **Ultra-high pressure LC for astaxanthin determination in shrimp by-products and active food packaging**. *Biomedical Chromatography*. 27 (2012b), 757-764.
- Sanches-Silva, A., Ribeiro, T.; Albuquerque, T., Paseiro, P., Sendón, R., Quirós, A., Sánchez-Machado, D., Valdez, H., Aurrekoetxea, G. & Costa, H. - **Ultra-high pressure LC determination of glucosamine in shrimp by-products and migration tests of chitosan films**. *Journal of Separation Science*. 35 (2012a), 633–640.
- Sánchez-Camargo, P., Martínez-Correa, H., Paviaña, L. & Cabrera, F. - **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspottednshrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*)**. *Journal of Supercritical Fluids*. 56 (2011), 164–173.
- Sánchez-Machado, D., López-Hernández, J. & Paseiro-Losada, P. - **High-performance liquid chromatographic determination of alpha-tocopherol in macroalgae**. *Journal of Chromatography A*. 976 (2002), 277-84.
- Seabra, M. & Pedrosa, L. - **Astaxantina: aspectos estruturais e funcionais**. *Revista Nutrição*. 23, 6 (2010), 1042-1050.

- Seppanen, C., Rahmani, M. & Csallany, A. - **Simultaneous Determination of Chlorophylls, Pheophytins,  $\beta$ -Carotene, Tocopherols, and Tocotrienols in Olive and Soybean Oils by High-performance Liquid Chromatography.** Journal of Food Science. 68 (2003), 1644–1647.
- Seymour, T. & Li, S. - **Characterization of a natural antioxidant from shrimp shell waste.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 44 (1996), 682–685.
- Shahidi, F. & Brown, J. - **Carotenoid Pigments in Seafoods and Aquaculture.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 38, 1 (1998), 1-67.
- Shahidi, F. & Synowiecki, J. - **Isolation and Characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoectes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 39, 8 (1991), 1527-1532.
- Sheehan, E., O'Connor, T., Sheehya, P., Buckley, D. & FitzGerald, R. - **Stability of astaxanthin and canthaxanthin in raw and smoked atlantic salmon (*Salmo salar*) during frozen storage.** Food Chemistry. 63, 3 (1998), 313–317.
- Silva, Fabiana – **Avaliação *in vitro* da actividade antioxidante dos carotenóides extraídos do músculo de camarões cultivados *Litopenaeus vannamei*.** Brasil, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, 2010. Tese de Mestrado.
- Silva, S. & Hall, G. - **Shrimp waste ensilation.** Infofish International. 94 (1994), 27-30.
- Sommer, T., Potts, W. & Morrisy, N. - **Utilization of microalgal astaxanthin by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** Aquaculture. 94 (1991) 79–88.
- Sowmya, R. & Sachindra, N. - **Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by *in vitro* assays and in membrane model system.** Food Chemistry. 134 (2012), 308–314.
- Storebakken, T., Foss, P., Schiedt, K., Autreng, E., Liaaen-Jensen, S. & Manz, U. - **Carotenoids in diets for salmonids: IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin.** Aquaculture. 65, 4 (1987), 279–292.
- Suetsuna, K. - **Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle.** Journal of Marine Biotechnology. 2 (2000), 5–10.
- Suganuma, K., Nakajima, H. & Imokawa, G. - **Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-I and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts.** Journal of Dermatological Science. 58, 2 (2010), 136-142.
- Swartz, M. - **Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction.** Separation Science Redefined. (2005), 8-13.

Tachaprutinun, A., Udomsup, T., Luadthong, S. & Wanichwecharungruang, S. - **Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation**. International Journal of Pharmaceutics. 374 (2009), 119–124.

Tapia-Salazar, M., Ricque-Marie, D., Nieto-López, M. & Cruz-Suárez, L. – **Uso de pimientos de Flor Cempasúchil (*Tagetes erecta*) como aditivos en alimentos para camarón *L.vannamei***. In: Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, IX, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Avances en Nutrición Acuícola: 2008.

Tejera, N., Cejas, R., Rodríguez, C., Bjerkgeng, B. & Bolaños, A. - **Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources**. Aquaculture. 207 (2007), 218-30.

Torrissen, O. & Christiansen, R. - **Requirements for carotenoids in fish diets**. Journal of Applied Ichthyology. 11 (1995), 225-230.

Torrissen, O., Tideman, E., Hansen, F. & Raa, J. - **Ensiling in Acid. A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by-products and improve uptake of this pigments by rainbow trout (*Salmo gairdneri*)**. Aquaculture. 26 (1981), 77-83.

Uenojo, M., Junior, M. & Pastore, G. – **Carotenóides: Propriedades, Aplicações e Biotransformação param formação de compostos de aroma**. Química Nova. 30, 3 (2007).

United States Pharmacopeia (USP) - USP 29, <1225> Validation of Compendial Methods. EUA, USP, 2005. [Consul. 20 Jul. 2013]. Disponível na internet: <[http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_c1225.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html)>.

USDA (United States Nutrient Database for Standard Reference) - **Nutrient data for 15145, Crustaceans, crayfish, mixed species, wild, raw**. USA: Nutrient Data Laboratory, 2013a. [Consult. 1 Jun. 2013]. Disponível na internet: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4499>>.

USDA (United States Nutrient Database for Standard Reference) - **Nutrient data for 15146, Crustaceans, crayfish, mixed species, wild, cooked, moist heat**. USA: Nutrient Data Laboratory, 2013b. [Consult. 1 Jun. 2013]. Disponível na internet: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4500?fg=&man=&lfacet=&format=&count=&max=5&offset=&sort=&qlookup=Crustaceans%2C+crayfish%2C+mixed+species%2C+wild%2C+cooked%2C+moist+heat>>.

Valderrama, J., Perrut, M. & Majewski, W. -**Extraction of astaxanthin and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide**. Journal of Chemical and Engineering Data. 48 (2003), 827-830.

Vilasoá-Martínez, M., Calaza-Ramos, C., López-Hernández, J., Lage-Yusty, M., Losada, P. & Quirós, A. - **Determination of vitamin E and carotenoid pigments by high**

**performance liquid chromatography in shell of *Chionoecetes opilio*.** *Analytica chimica acta*. 617 (2008), 225–229.

Walker, L., Wang, T., Xin, H. & Dolde, D. - **Supplementation of Laying-Hen Feed with Palm Tocots and Algae Astaxanthin for Egg Yolk Nutrient Enrichment.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 60, (2012) 1989–1999.

White, J., Travers, D. & Sherry, K. – **Deposition of astaxanthin isomers in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) fed different sources of pigment.** *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2206 (1998), 1-27.

Xavier, A., Mercadantel, A., Domingos, L. & Viottol, W. - **Development and validation of a spectrophotometric method for determination of lutein colorant added to nonfat yogurt.** *Química Nova*. 35, 10 (2010).

Yang, J., Tan, H., Yang, R., Sun, X., Zhai, H. & Li, K. – **Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* Fermentation of Cassava Residues Substrate.** *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*. 13, 2, (2011).

Yasui, Y., Hosokawa, M., Mikami, N., Miyashita, K. & Tanaka, T. - **Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines.** *Chemico-Biological Interactions*. 756, 193 (2011), 79-87.

Yuan, C., Jin, Z., Xu, X., Zhuang, H. & Shen, W. - **Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin.** *Food Chemistry*. 109 (2008), 264–268.

Yuan, J. & Chen, F. - **Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection.** *Biotechnology Techniques*. 11, 7 (1997), 455–459.

Yuan, J. & Chen, F. - **Isomerization of trans-astaxanthin to cis-isomers on organic solvents.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (1999), 3656-3660.

Zavaleta, Miriam Franco – **Extracción de astaxantina a partir de residuos de camarón ensilados por métodos ácido y bacteriano.** México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas, 2010. Tese de Doutoramento.

## ANEXO I - Fórmulas Aplicadas

**Equação 1** Desvio-padrão relativo (RSD). Onde  $\sigma$  é o desvio-padrão e  $\mu$  é a média dos resultados (Almeida & Bronze, 2005).

$$RSD(\%) = \frac{\sigma}{\mu} \times 100$$

**Equação 2** Recuperação (Almeida & Bronze, 2005).

$$Rec = \frac{CrVr - CaVa}{CpVp} \times 100$$

Em que,

Cr – Concentração do analito na amostra fortificada;

Vr – Volume de amostra do ensaio de recuperação (Volume da amostra + Volume do padrão);

Ca – Concentração do analito na amostra não fortificada;

Va – Volume de amostra utilizada no ensaio de recuperação;

Cp – Concentração do padrão de analito utilizado para fortificar a amostra;

Vp – Volume de padrão de analito utilizado no ensaio de recuperação.

**Equação 3** Percentagem de humidade (H).

$$H(\%) = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Sendo:

$m_0$  – massa, expressa em gramas, da cápsula de porcelana (ou da cápsula com a areia e a vareta de vidro);

$m_1$  – massa, expressa em gramas, da cápsula de porcelana (ou da cápsula com areia e a vareta de vidro) com a amostra;

$m_2$  – massa, expressa em gramas, da cápsula de porcelana (ou da cápsula com a areia e a vareta de vidro) com a amostra após secagem (peso constante).

## **Fontes das imagens apresentadas na capa:**

Wikimedia Common – Alemanha: act. 22-01-2013. [Consultado 5 de Setembro]. Disponível na internet: < <http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMikrofoto.de>>

Good Food – Inglaterra: act.10-08-2013. [Consultado 5 de Setembro]. Disponível na internet: < <http://blogs.kcrw.com/goodfood/2013/07/recipe-green-lightning-shrimp/>>