

Renata dos Passos

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CAROTENÓIDES
PROVENIENTES DE BIOMASSAS DE INTERESSE PARA A AQUICULTURA**

Florianópolis

2007

Renata dos Passos

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CAROTENÓIDES
PROVENIENTES DE BIOMASSAS DE INTERESSE PARA A AQUICULTURA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como um dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Luiz Henrique Beirão.

Florianópolis

2007

Passos, Renata dos

Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aqüicultura. Renata dos Passos. Florianópolis, UFSC/PGCAL, 2007.

77 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, 2007.

1. Carotenóides provenientes de fontes naturais para implementação na alimentação animal. 2. Pescados – Tese. Beirão, Luiz Henrique. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência dos Alimentos, Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aqüicultura

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CAROTENÓIDES
PROVENIENTES DE BIOMASSAS DE INTERESSE PARA A AQUICULTURA

Por

Renata dos Passos

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela comissão formada por:

Presidente: Luiz Henrique Beirão

Membro: Pedro Luiz Manique Barreto

Membro: Milton Luiz Pinho Espírito Santo

Membro: Marcos Pessatti

Membro: César Damian

Coordenador: Marilde Bordignon

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2007.

Aos meus pais, que foram e sempre serão as grandes inspirações da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre me confortou nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Pedro Paulo e Maurina, ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Fernanda, minha sobrinha Nathalia pelo apoio e amor incondicional.

À Evandro Fernandes, meu marido, e sua família, José, Rosário e Rui pelo amor e confiança depositados em mim.

Ao meu orientador, Professor Doutor Luiz Henrique Beirão, por ser muito mais que um orientador, por ter sido pai e amigo, estando sempre pronto pra nos ajudar.

À minha orientadora *estrangeira*, Luisa Gouveia, por ter acreditado em mim, ser tão generosa e ter sempre aquele sorriso a minha espera.

Ao meu amigo Francisco Lagreze, o meu braço “direito”, sem o qual eu não conseguiria prosseguir.

Ao INETI, mais carinhosamente ao DER, a todos que lá estavam pelo simples fato de me acolherem como um deles, em especial ao Dr. Rui Mendes e Beatriz Nobre.

Ao Prof. Dr. José Fontana, Dra. Tânia Bonfim, Dr. Marcelo Maraschin e Danilo Moriel por toda co-orientação e amizade dispensados a mim.

Ao Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC, em especial a Daniela Magonis e Walter, pelo apoio.

Às minhas amigas que sempre tiveram disposição pra me alegrar quando eu já não tinha forças, Hílina Morais, Cristina Mendes, Christiane Effting e Melissa Kayser.

Ao Sérgão, Sérgio de Souza, pelas horas de trabalho por mim e pela amizade.

À todos funcionários da PGCAL, pelas muitas contribuições que me deram.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que acreditaram em mim.

"O saber a gente aprende com os mestres e com os livros. A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes." Cora Coralina

RESUMO

PASSOS, Renata dos. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aqüicultura (Extraction and chemistry characterization of carotenoids from interesting biomass for aquaculture)**. Tese de Doutorado, Florianópolis, 2007.

O processo de extração de pigmentos naturais pode ser feito através da utilização de solventes orgânicos, porém, a presença de resíduos de solvente e a instabilidade do composto obtido são fatores que limitam a sua aplicação. Uma das técnicas mais promissoras é a extração supercrítica que vem sendo considerada uma técnica atrativa, principalmente no que diz respeito ao meio ambiente e à qualidade dos produtos obtidos. Neste contexto, e com o intuito de aumentar o valor do produto não apenas em aspectos econômicos, mas também nutricionais este estudo vem trazer como perspectiva a adição de pigmentos às rações de pescados através de fontes naturais. Para isso, foi estudada a extração de pigmentos carotenóides das biomassas *Phaffia rhodozyma*, *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* por extração convencional por solventes e extração supercrítica. Estudos com a incorporação da levedura *Phaffia rhodozyma* e da microalga *Chlorella vulgaris in natura* em rações para crustáceos também foram desenvolvidos, com o intuito de estudar-se a possível inclusão destes aos alimentos de maneira menos dispendiosa e sem que estes fossem previamente tratados. Dentro dos estudos de extração, a extração supercrítica mostrou-se de alta eficiência quanto à extração de compostos carotenóides. Já dentro da extração com solventes orgânicos, o método desenvolvido por BONFIN, 1998 demonstrou melhor rendimento quanto a extração de carotenóides. Nos experimentos para a incorporação de pigmentos naturais a alimentação de crustáceos, as biomassas naturais, *Phaffia rhodozyma* e *Chlorella vulgaris* mostraram-se eficientes quanto à coloração dos animais, e não houve diferenças significativas em relação às outras fontes de carotenóides já comumente inseridas na alimentação destes animais.

Palavras-chave: Carotenóides, astaxantina, camarões.

ABSTRACT

PASSOS, Renata dos. **Extraction and chemistry characterization of carotenoids from interesting biomass for aquaculture. (Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aqüicultura)** Tese de Doutorado, Florianópolis, 2007.

The process of natural pigment extraction can be made through the use of solvent organic, however, the solvent instability and presence of residues of the gotten composition are factors that limit its application. One of the techniques most promising is the supercritical extraction that comes being considered one attractive technique, mainly in what it says respect to the environment and the gotten product quality. In this context, and with intention to increase the value of the product not only in aspects economic, but also nutritional this study it comes to bring as perspective the addition of pigments to the fished rations of through natural sources. For this, the pigment extraction of the biomass *Phaffia rhodozyma*, *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella vulgaris* was studied for conventional extraction for solvent and supercritical extraction. Studies with the incorporation of the leavening *Phaffia rhodozyma* and the *Chlorella vulgaris* in natura in rations for crustaceans had been also developed, with intention to study it possible inclusion of these to foods in less cost way and without these previously were treated. Inside of the extraction studies, the supercritical extraction revealed of high efficiency how much to the carotenoids composite extraction, already inside of the extraction with solvent organic, the method that demonstrated income better how much the extraction of carotenoids was the method developed for BONFIN, 1998. In the experiments for the natural pigment incorporation the feeding of crustaceans, the natural biomass, *Phaffia rhodozyma* and *Chlorella vulgaris* had revealed efficient how much to the coloration of the animals, and it did not have significant differences in relation to the other normally sources of carotenoids already in the feeding of these animals.

Key-words: carotenoids, astaxanthin, shrimp

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão bibliográfica	4
2.1	Pigmentos	4
2.1.1	Definição	4
2.1.2	Classificação	4
2.1.3	Corantes alimentares	5
2.1.4	Pigmentos naturais	5
2.1.4.1	Pigmentos carotenóides	6
2.1.4.1.1	Características químicas e diversidade estrutural	6
2.1.4.1.2	Propriedades Químicas e Físico-químicas	7
2.1.4.1.3	Fontes Naturais	9
2.1.4.1.4	Funções biológicas nos organismos	10
2.1.4.1.5	Síntese	12
2.1.4.1.6	Produção industrial de carotenóides	12
2.1.4.1.7	Aplicações	14
2.1.4.1.8	Carotenóides de interesse na Aqüicultura	15
2.2	Suplementação alimentar para peixes	16
2.3	Suplementação alimentar para a carcinicultura	18
2.4	Mercado	22
2.5	Métodos analíticos aplicados em estudos de carotenóides	24
2.5.1	Extração	24
2.5.2	Separação e identificação	29
3	Referencia bibliográfica	30
4	Astaxanthin from the yeast <i>Phaffia rhodozyma</i>. supercritical carbon dioxide and organic solvents extraction	37
5	Fontes naturais de carotenóides de interesse para aquicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração	43
6	Pigmentation of pacific white shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>, BOONE, 1931) with carotenoids from natural sources.	55
7	Anexos	72

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a aquicultura apresenta-se como uma alternativa promissora para a produção de alimentos, dado ao grande potencial em termos de espécies adaptadas, à abundância de recursos naturais e clima favorável. Como exemplo disto, a produção de camarões de cultivo vem crescendo nos últimos anos (14,66% entre os anos de 2000 e 2005), onde a produção mundial atingiu cerca de 2,36 milhões de toneladas em 2005, e onde o Brasil contribuiu com 65 mil toneladas em 15 mil hectares de cultivo (RIECHE e MARTINS MORAES, 2006)

A União Européia tem um consumo aparente de 9,1 milhões de t, em média 22 kg/pessoa/ano, enquanto Portugal, Noruega e Espanha têm o maior consumo *per capita* da Europa (60,2, 41,1 e 37,7 kg, respectivamente). Na América do Sul, Peru e Chile, os maiores produtores, têm um consumo *per capita* superior à média mundial, ao contrário do Brasil, onde chega somente a 6,4 kg/pessoa/ano, bem abaixo, portanto, da média mundial.

A média do consumo *per capita* mundial dobrou entre 1950 e 1989, mas ficou estável em cerca de 13,5 kg desde então, o que significa um crescimento quase igual ao da população (FAVERET FILHO e SIQUEIRA, 2007).

Dentre as diferentes formas de produção sustentada e extrativismo, a principal diferença encontra-se na qualidade do produto. No sistema de cultivo, é possível controlar doenças e outros interferentes na qualidade sensorial e higiênico-sanitárias do camarão. No entanto, a coloração alaranjada característica destes animais fica comprometida.

A astaxantina (3, 3'-dihidróxi- β - β -caroteno-4,4'-diona) é um pigmento natural presente em crustáceos e em algumas espécies de algas, sendo este o principal responsável, na maioria destes animais, pela coloração amarelo-avermelhada de algumas espécies de camarão, salmão e de outras espécies aquáticas, assim como em algumas espécies de aves como, por exemplo, o Flamingo. Este carotenóide pode ser utilizado tanto como pigmento em alimentos como também, nos produtos derivados de pescado, na aquicultura, onde tem uma importante função, a de nutriente na alimentação de pescados

como o salmão, a truta e o camarão, criados fora de seu ambiente natural. A presença de pigmentos carotenóides na dieta influencia na coloração dos pescados, favorecendo a aceitabilidade do produto obtido a partir deste. A falta de astaxantina na dieta de algumas espécies de pescados de cativeiro, como no caso do camarão e do salmão, faz com que sua coloração presente na carne seja diferente da coloração do mesmo em seu ambiente natural (MORIEL et al., 2005).

A astaxantina é um dos mais caros ingredientes usados na alimentação de salmões e camarões e em decorrência do interesse crescente pela aquicultura nos últimos anos, a criação de pescados de alto valor econômico e nutritivo em fazendas tem aumentado, de modo que a produção de astaxantina tem despertado, conseqüentemente, um maior interesse econômico.

O desenvolvimento de estratégias biotecnológicas alternativas à síntese sintética para a obtenção de pigmentos carotenóidicos, com vistas à sua aplicação em alimentos destinados ao arraçoamento de algumas espécies de pescados, constitui-se em fator de agregação nutricional e de valor econômico ao produto final. Esta abordagem baseia-se no fato de que os compostos carotenóidicos são moléculas com alto poder antioxidante e, dada a sua coloração, tornam o produto mais atrativo ao consumidor.

A síntese química da astaxantina foi descrita em patentes americanas, todavia, o custo da astaxantina sintética é muito elevado, além do que muitos países proibiram o uso de carotenóides sintéticos na alimentação animal.

O processo de extração destes pigmentos pode ser feito através da utilização de solventes orgânicos, porém, a presença de resíduos de solvente e a instabilidade do composto obtido são fatores que limitam a sua aplicação. Além disso, a comunidade mundial tem feito severas restrições quanto ao uso de compostos extraídos dessa forma, uma vez que esse método pode trazer traços de solventes tóxicos à saúde humana no produto final.

Diversos protocolos de extração de pigmentos carotenóidicos com solventes orgânicos têm sido relatados na literatura, os quais revelam que

aproximadamente 90% dos carotenóides presentes em crustáceos consistem de astaxantina e ésteres de astaxantina. Em várias espécies de crustáceos, a astaxantina, encontra-se ligada e esterificada em combinação com proteínas.

Uma estratégia analítica que tem viabilizado aumentos de rendimento do processo de extração de astaxantina consiste na realização de um pré-tratamento enzimático da biomassa, anterior à etapa de extração. Para tal, a hidrólise do complexo carotenóide-proteína é alcançada através do uso de proteases, de forma a liberar o componente carotenóidico no meio de reação.

Além disso, a extração supercrítica vem sendo considerada uma técnica atrativa, principalmente no que diz respeito ao meio ambiente e à qualidade dos produtos obtidos, por ser um processo livre de resíduos e não provocar a degradação do extrato. Esta nova técnica de extração apresenta a característica de empregar como solvente um gás denso (fluido supercrítico), usualmente o dióxido de carbono, além da possibilidade de operar com alta seletividade e eficiência, permitindo a extração diferencial de solutos. As principais áreas de aplicação desta técnica têm sido nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de química fina, por envolverem produtos de alto valor agregado nos quais a qualidade é determinante.

Neste contexto, e com o intuito de aumentar o valor do produto não apenas em aspectos econômicos, mas também nutricionais pesquisas enfocando a adição destes pigmentos naturais às rações de pescados têm sido feitas, como é o caso da administração de astaxantina a algumas espécies de pescados.

Em sendo os objetivos deste trabalho alcançados, será possível agregar valor tanto à matéria-prima como ao produto final, favorecendo assim o produtor e a indústria de beneficiamento do produto. Além dos atrativos organolépticos fornecidos ao produto, também deve-se ressaltar os benefícios à saúde já relatados provenientes da ingestão destes pigmentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PIGMENTOS

Pigmentos são cores que habitualmente pode-se observar durante toda vida humana. Estão presentes em todos os organismos do mundo, sendo as plantas as principais produtoras. Naturais ou sintéticos, os pigmentos, são utilizados na medicina, na alimentação, nas roupas, cosméticos, decoração e em diversos outros setores.

2.1.1 DEFINIÇÃO

Pigmentos são compostos químicos que absorvem a luz em comprimentos de onda na faixa do visível. Produzem cor devido a estrutura específica da molécula (cromóforo), esta estrutura captura a energia e a excitação que é produzida por um elétron de um orbital externo a um orbital maior; a energia não absorvida é refletida e/ou refratada para ser capturada pelo olho, e impulsos neurais gerados são transmitidos ao cérebro onde eles podem ser interpretados como uma cor (DELGADO-VARGAS, et al, 2000).

2.1.2 CLASSIFICAÇÃO

A classificação pode ser feita através da origem, como naturais, sintéticos, ou inorgânicos; da estrutura química e como aditivos de alimentares.

2.1.3 CORANTES ALIMENTARES

Os aditivos pigmentantes naturais usados comumente para aumentar ou dar cor aos alimentos são geralmente extraídos das pimentas, beterrabas, uvas, açafrão, carnes entre outros.

É possível enumerar algumas razões para usar pigmentos nos alimentos (DELGADO-VARGAS, et al, 2000):

1. Restaura a aparência original de alimentos caso estes tenham perdido as características durante o processamento.
2. Assegura a uniformidade da cor e diminuir as variações de tonalidades causadas pelas estações e épocas de colheita de alguns ingredientes;
3. Protege o sabor e vitaminas susceptíveis a luz;
4. Dá aos alimentos uma aparência atrativa;
5. Preserva a identidade ou característica a qual o alimento é reconhecido;
6. Intensifica cores que são normalmente encontradas nos alimentos as quais o consumidor associa;
7. Auxilia na aceitação visual de qualidade do alimento.

2.1.4 PIGMENTOS NATURAIS

Nos dias de hoje, o número de vantagens dos pigmentos naturais sobre os sintéticos têm aumentado devido às propriedades farmacológicas dos pigmentos naturais que se tem descoberto. Além disso, alguns produtos têm um ótimo valor de mercado somente porque na fabricação destes admitti-se apenas corantes naturais. Pode-se citar o caso do Queijo Cheddar, onde pode-

se adicionar apenas pigmentos vindo do urucum (FREUND, *et al.*, 1988) e o caso de produtos derivados de frangos onde os pigmentos sintéticos não se adequam (MARUSICH & BAUERNFEIND, 1981). Entretanto, é necessário notar que corantes sintéticos tem vantagens muito bem conhecidas como o alto poder pigmentante, a estabilidade, estocagem, facilidade no processamento, e além disso, serem mais baratos e estarem disponíveis em quantidades sem limites (WISSGOT & BORTLIK, 1996).

Os pigmentos naturais apresentam outra função além de embelezar a natureza. É através deles que se proporciona a fotossíntese, o que seria impossível ocorrer sem a presença de clorofilas e carotenóides. Além disso, é reportada pela literatura a ação antioxidante, de fotoproteção (MIDDLETON & TERAMURA, 1993), de mecanismos de defesa das plantas (SNYDER & NICHOLSON, 1990), assim como envolvimento nos processos sexuais de plantas e animais.

Atualmente sabe-se que além de pigmentar, colorir e de ter diversas funções nos organismos onde estes compostos são encontrados, estes compostos podem apresentar efeitos farmacológicos benéficos aos que os consomem.

Dentro dos muitos pigmentos naturais existentes, esse trabalho enfocará, devido seu objetivo, os pigmentos da família dos carotenóides, em especial a astaxantina.

2.1.4.1 PIGMENTOS CAROTENÓIDES

2.1.4.1.1 Características Químicas e Diversidade Estrutural

Os carotenóides são compostos químicos da classe de hidrocarbonetos (carotenos) e de seus derivados oxigenados (xantofilas). Sua estrutura básica reflete seu modo de biossíntese e consiste de oito unidades isoprenóides

unidas e uma série de duplas ligações conjugadas conferindo-lhes a característica cromófora (DAVIES, 1976).

Atualmente são conhecidos mais de 600 carotenóides naturais, todos derivados do mesmo esqueleto isoprenóide C₄₀, por modificações tais como hidrogenação, oxidação, ciclização, substituição, eliminação, adição e rearranjo. A estrutura básica é ilustrada pelo β,β-caroteno (Figura 1).

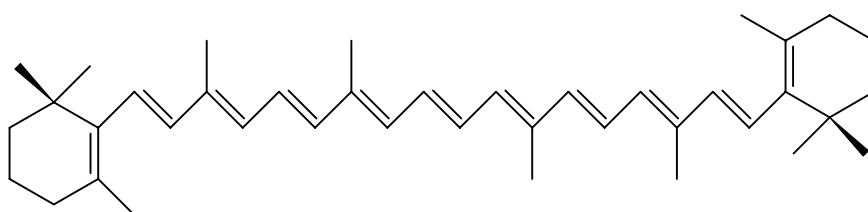


Figura1: Estrutura química do β,β-Caroteno.

2.1.4.1.2 Propriedades químicas e físico-químicas

Os carotenóides são substâncias lipofílicas e geralmente insolúveis em água (BRITTON *et al.*, 1995).

As propriedades de absorção da luz dos carotenóides derivam da presença de seu grupo cromóforo, a cadeia poliênica. Um cromóforo de sete ou mais duplas ligações conjugadas confere a capacidade de absorver a luz na região visível, atribuindo-lhes colorações do amarelo ao vermelho (BRITTON *et al.*, 1995).

O sistema poliênico também confere à molécula alta susceptibilidade à degradação oxidativa e à isomerização geométrica causada pela luz, calor ou ácidos (DAVIES, 1976; BRITTON *et al.*, 1995).

As propriedades químicas e físicas dos carotenóides *in vivo* podem ser modificadas pela interação com outras moléculas em seu microambiente e serem significativamente diferentes daquelas dos carotenóides livres em soluções. Essas interações com outras moléculas, especialmente proteínas podem ser críticas ao funcionamento ou ações da molécula do carotenóide *in vivo*, por exemplo, em membranas (BRITTON *et al.*, 1995).

Ultimamente, os diversos efeitos biológicos atribuídos aos carotenóides tem sido explicados em termos das propriedades físicas e químicas destes compostos, das quais muitas podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1: Propriedades físicas e químicas atribuídas aos carotenóides (KRINSKY, 1994):

PROPRIEDADES FÍSICAS E FISICO-QUÍMICAS ATRIBUÍDAS AOS CAROTENÓIDES
<ul style="list-style-type: none">• Seqüestrador de oxigênios singletes• Absorção da luz• Solúveis em solventes orgânicos• Isomeria• Liga-se a superfícies hidrofóbicas• Prontamente oxidado

2.1.4.1.3 Fontes Naturais

As mais importantes fontes de carotenóides são as plantas, onde geralmente as cores brilhantes de carotenóides são cobertas pelo verde dos pigmentos clorifílicos (por exemplo, nas folhas de vegetais verdes). Em um número elevado de casos, nas plantas maduras os conteúdos de clorofila decrescem deixando para os carotenóides a responsabilidade pelas belas cores de muitos frutos como laranjas, limões, morangos, tomates, pimentão e muitas flores.

Carotenóides são encontrados na alimentação humana principalmente em vegetais onde estes estão localizados nas raízes, folhas, talos, semente, frutas e flores. Cerca de 60 diferentes carotenóides são encontrados nas frutas e vegetais presentes na alimentação humana (BAUERNFEIND, 1972; KHACIHIK *et al.*, 1992; SCOTT & HART, 1994)

Existe uma tendência mundial à utilização de fontes naturais de nutrientes e à exclusão de componentes sintéticos da cadeia alimentar. Estes fatores têm aumentado o interesse em fontes naturais de carotenóides na inserção de pigmentos carotenoidicos em rações como e o caso da astaxantina. Diversas companhias estão investindo na obtenção de astaxantina por fontes naturais (MCCOY, 1999). Segundo JOHSON & AN (1991), as fontes naturais mais promissoras de astaxantina são a microalga *Haematococcus pluvialis* e a levedura *Phaffia rhodozyma*.

A microalga *Chlorella vulgaris* representa igualmente, uma forma natural encapsulada de carotenóides com potencialidades indutoras de cor em produtos como gema de ovo de galinhas poedeiras (CARVALHO, et al., 2006) e carne de trutas arco-íris (GOUVEIA, 1996a,b).

Alem disso, alguns crustáceos e seus derivados podem ser utilizados na obtenção de pigmentos. Na Noruega, resíduos de camarão (*Pandalus borealis*) têm sido tradicionalmente utilizados como fontes naturais de pigmentos para trutas e salmões. Entretanto, os níveis de carotenóides nas preparações obtidas a partir destes resíduos são geralmente baixos (0 a 200 mg/Kg) e uma

pigmentação satisfatória requer a adição de 10 a 25% por peso de extrato quitinoso na dieta. Além disso, estes resíduos apresentam um nível elevado de cinzas, quitina e umidade, e níveis baixos de proteína e outros nutrientes, limitando a sua utilização. Um melhoramento na extração e concentração dos carotenóides nestes resíduos poderia viabilizar sua utilização na pigmentação (JOHNSON; AN, 1991; JOHNSON; CONKLIN; LEWIS, 1977).

Farinas e extratos oleosos de crustáceos que contêm carotenóides têm sido também investigados com resultados variados, os quais têm dependido do conteúdo dos pigmentos nos resíduos e do método pelo qual os pigmentos têm sido extraídos (HOSANG, 2001). Até agora não tem sido possível economicamente a incorporação dessas fontes pigmentantes na indústria salmonera devido aos custos de produção e da disponibilidade da astaxantina nesses.

Atualmente a maior parte dos carotenóides produzidos biologicamente e ou biotecnologicamente consiste na cultura de algas, bactérias e fungos produtores destes compostos.

2.1.4.1.4 Funções biológicas nos organismos

Carotenóides em crustáceos assumem diversas funções biológicas importantes como a reprodução, crescimento e a estabilização protéica. Entretanto, o mecanismo fisiológico ainda necessita de maiores investigações (LATSCHA, 1990).

Muitas das funções, das aplicações e usos dos carotenóides são uma consequência das propriedades de absorção de luz do cromóforo poliênico. As principais funções biológicas na natureza, tais como coloração, fotossíntese e fotoproteção, estão bem elucidadas e tem sido sugerido um papel como fotorreceptores na fototaxia. Entretanto, a grande importância dos carotenóides na nutrição e saúde do homem e dos animais não está baseada nas propriedades de absorção de luz das moléculas (BRITTON *et al.*, 1995).

Em resumo as funções biológicas dos carotenóides para os animais, incluindo o homem podem ser divididas em dois grupos diferentes, nomeadamente em fenológicas e fisiológicas (tabela 2).

Tabela 2. Funções biológicas de carotenóides em animais (LATSCHA, 1990).

FUNÇÕES BIOLÓGICAS DE CAROTENÓIDES EM ANIMAIS.	
<ul style="list-style-type: none">• Percepção da luz• Vitamina A• Estabilização da quitina• Transferência de pigmentos• Reprodução• Quimiopercepção• Redução do Colesterol• Suplementação de oxigênio intracelular• Crescimento• Antioxidante• Anticarcinogênico• Aceptor de elétrons• Estabilização de proteínas/membranas• Transporte de cálcio• Melhora da performance do fígado• Preventivo do câncer• Curativo de ferimentos• Resposta imune• Endócrino• Balanço hídrico• Proteção contra: oxidação, irradiação, alta temperatura, digestão enzimática.	

2.1.4.1.5 Síntese

Os carotenóides, em geral, e como por exemplo a astaxantina pode ser obtida de fontes naturais ou sintetizada por vias químicas com ou sem etapas microbiológicas. Também pode ser sintetizada a partir de intermediários de carotenóides, como cantaxantina (JOHNSON; AN, 1991).

A síntese total da 3S,3'S-astaxantina é possível em função de sintonas opticamente ativas utilizando etapas catalíticas químicas e microbiológicas. As etapas microbiológicas envolvem modificações estereoseletivas em átomos de carbono e oxigênio específicos nos precursores. Desta forma, a combinação de etapas químicas e microbiológicas tem sido eficiente na preparação industrial de astaxantina quiral. Entretanto, algumas limitações das etapas microbiológicas podem ser encontradas, como baixo rendimento, baixa tolerância dos microorganismos pelo substrato, e dificuldade na recuperação e prevenção da conversão extensiva dos intermediários (JOHNSON; AN, 1991).

2.1.4.1.7 Produção industrial de carotenóides

A produção industrial de β,β -caroteno começou em 1954, e desde então, a síntese comercial de carotenóides vem sendo desenvolvida. Atualmente, são vendidos por ano cerca de US \$300 milhões em carotenóides sintéticos (BRITTON *et al.*, 1995).

Os dois principais produtores industriais, Hoffmann-La Roche e BASF, produzem seis diferentes carotenóides, o β,β -caroteno, a cantaxantina, a astaxantina (mistura de dois enantiômeros e a forma *meso*), os apocarotenóides e citranaxantina (C₃₃) (BRITTON *et al.*, 1995).

Uma parte dispendiosa, apesar de essencial, do processo industrial é a transformação do composto lipofílico, cristalino e puro em formulações que são apropriadas para a aplicação industrial. A dispersão microcristalina do carotenóide em uma gordura comestível é usada na produção de margarinas. Pós contendo carotenóides como uma microdispersão em um colóide protetor

hidrofílico são usados para meios aquosos, tais como suco de frutas (BRITTON *et al.*, 1995).

O preço de mercado, por grama, é em torno de R\$ 57 para o β,β -caroteno, e R\$ 633 para a astaxantina, já um miligrama de zeastaxantina chega a custar R\$ 1690 (ANONIMO, 2006).

Os pigmentos produzidos por métodos biológicos têm surgido como um crescente segmento do mercado industrial. Eles são aplicados em alimentos, como suplemento nutricional, e em indústrias cosmética e farmacêutica. Desde o início dos anos 80, várias companhias biotecnológicas têm desenvolvido métodos para produzir pigmentos em culturas bacterianas, de algas e fungos. Os biopigmentos normalmente entram em mercados existentes para pigmentos obtidos por síntese química. Para sobreviver, os materiais produzidos biologicamente devem oferecer vantagens em seu emprego, custo e/ou conformidade com as normas. As três principais categorias emergentes de biopigmentos deste mercado são os carotenóides, xantofilas e melanina (IB MARKET FORECAST, 1992).

Somente os aditivos de cor que estão registrados no *Code of Federal Regulations* (CFR) podem ser usados legalmente nos Estados Unidos para promover a coloração do salmão e outros animais utilizados como alimento. A astaxantina foi recentemente relacionada pelo *Food and Drug Administration* (FDA, Estados Unidos) como um aditivo para pigmentar somente a carne de salmonídeos e o limite permitido foi de 8 mg de pigmento por quilograma de alimento para peixe (VÁZQUEZ; SANTOS, 1998). A cantaxantina está registrada no CFR como um aditivo de cor, mas ainda não foi aprovada pelo FDA. Porém, a astaxantina, e não a cantaxantina, é normalmente encontrada no salmão selvagem (TURUJMAN *et al.*, 1997).

2.1.4.1.7 Aplicações

Os carotenóides apresentam uma grande importância na coloração de organismos vivos. Os pigmentos naturais, incluindo os carotenóides, são amplamente usados como aditivos em alimentos industrializados para dar cores atrativas. Extratos naturais têm sido usados com esta finalidade por séculos, especialmente anato (bixina), açafrão (crocina), tomate (licopeno, e paprica (capsantina)). Derivados carotenóides sinteticos, identicos aos naturais, sao produzidos em larga escala para a coloracao de alimentos, e o interesse na producao industrial de carotenóides por biotecnologia tem vindo a aumentar.

A principal aplicacao da astaxantina  na alimentacao de salmondeos (trutas e salmoes) criados em cativeiro. Estes animais nao sao capazes de produzir astaxantina. Na natureza, adquirem pigmentacao pela ingestao do zooplancton e de crustceos. Entretanto, em cativeiro, um suprimento de astaxantina deve ser fornecido juntamente com a alimentacao, para que seja absorvido e depositado na carne, conferindo a coloracao caracterstica destes peixes e aumentando a aceitacao comercial de seus produtos.

No incio da dcada de 80, a cantaxantina sintetica era o principal pigmento utilizado na alimentacao destes peixes. Entretanto, estudos demonstraram que a astaxantina apresenta superioridade como agente pigmentante e se deposita de maneira mais eficiente. Alm disso,  o pigmento encontrado naturalmente nos salmondeos (JOHNSON; AN, 1991).

A levedura *P. rhodozyma* tambm pode ser utilizada na criacao de aves e producao de ovos, com a finalidade de promover uma maior pigmentacao em seus produtos e derivados, aumentando sua aceitacao no mercado. AKIBA *et al.* (2000 e 2001) verificaram a influncia da adicao da levedura *P. rhodozyma* na racao de frango, com relacao  pigmentacao da gema de ovos e na sua carne. Esses autotes demonstraram que a levedura adicionada era capaz de promover um aumento na pigmentacao da mesma e que a pigmentacao aumentava com o aumento na concentracao de astaxantina na dieta. Assim, comprovou-se que a astaxantina apresentava uma eficincia 1,5 a 2 vezes

maior que a páprica, um outro aditivo alimentar utilizado com o mesmo objetivo, despertando grande interesse na utilização da levedura *P. rhodozyma* na pigmentação de gema de ovos. Além disso, a alimentação destes animais com células rompidas da levedura *Phaffia rhodozyma* apresentava uma eficiência maior do que com células intactas. Além disso, a pigmentação também era proporcional à concentração de astaxantina na dieta.

2.1.4.1.8 Carotenoides de interesse na Aquicultura

Astaxantina

A astaxantina (figura 2) em sua forma livre, esterificada ou formando complexos com proteínas, é o carotenóide mais abundante nos crustáceos, sendo estes a fonte natural de pigmentos para os salmonídeos silvestres

Astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) é um oxicarotenóide de fórmula $C_{40}H_{52}O_4$ e peso molecular 596,86. Na forma cristalina e pura, aparece como um pó fino de coloração escura violeta amarronzada. Seu ponto de fusão é aproximadamente 224 °C. É insolúvel em solução aquosa e na maioria dos solventes, mas pode ser dissolvida a temperatura ambiente em diclorometano, clorofórmio, acetona, dimetilsulfóxido e outros solventes não polares. Seu espectro de absorção representa um polieno conjugado, com $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 489 nm em clorofórmio, 478 nm em etanol e 480 nm em acetona (JOHNSON; AN, 1991).

A astaxantina tem sido identificada em muitos microorganismos incluindo a microalga *Haematococcus pluvialis* (JOHNSON & AN, 1991), *Chlorella* sp, e *Chlorococcum* sp. (LIU & LEE, 1999; ZHANG, LEE, NG & PHANG, 1997), e a levedura *Phaffia rhodozyma* (JOHNSON, LEWIS & GRAU, 1980), e na bacteria marinha *Agrobacterium aurantiacum* (FRASER, MIURA, & MISAWA, 1997).

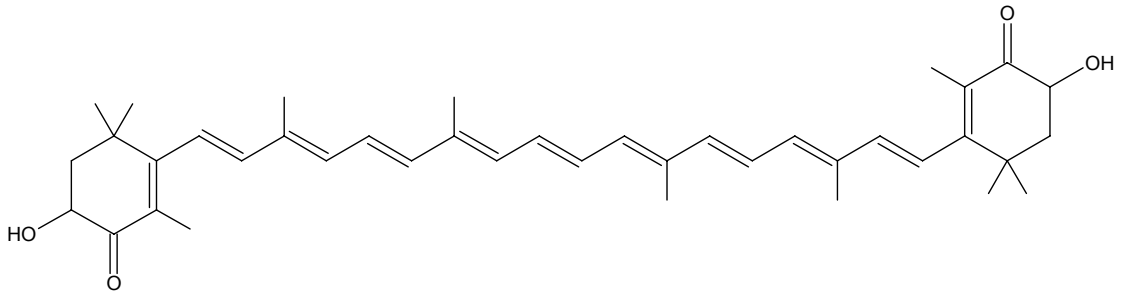


Figura 2 – Fórmula estrutural da Astaxantina (JOHNSON, AN 1991).

. A astaxantina de origem natural tem sido avaliada como uma fonte pigmentante, em alguns estudos os autores incorporam organismos como o camarão, *Penaeus japonicus* (CHOUBERT & LUQUEST, 1983), Copépodos, *C. Finmarchicus*, krill, *Euphasia sp.* (LAMBERSTEN & BRAEKKAN, 1971), em dietas secas ou desidratadas afim de que estas possam produzir pigmentação da carne em diferentes graus de intensidade, variando a coloração conforme a concentração de pigmentos nesses organismos.

2.2 Suplementação alimentar para peixes.

A coloração avermelhada contribui significativamente para a imagem da carne dos salmonídeos, e podem ter um grande valor, se analisado como indicador de qualidade do produto (SYLVIA *et al.*, 1995, 1996). Esta característica é distintiva desse grupo, o que contribui a dar um selo de exclusividade a sua imagem, diferentes de outros produtos alimentícios de origem animal que são julgados basicamente pelo seu sabor, textura etc. Conseqüentemente, o grau de pigmentação da carne é um fator preponderante na determinação do preço que alcança este produto no mercado, em qualquer forma de apresentação.

Em estudo feito por CHOUBERT & HEINRICH em 1993, os autores demonstraram que uma alimentação contendo 20mg/kg de astaxantina na forma de adição de microalgas *Haematococcus pluvialis* promove coloração na carne de trutas *Oncorhynchus mykiss*, onde a concentração atingiu 6,2mg/kg do peixe. Essa concentração foi considerada adequada pelos autores, no

entanto quando utilizada a astaxantina comercial de forma pura, esta apresentou melhores resultados quanto a coloração da carne do pescado. Esse fato confirma a eficiência da astaxantina livre (comercial) sobre a eficiência da astaxantina esterificada (encontrada nas microalgas) (FOSS *et al.*, 1987). Entretanto, esse resultado contradiz SIMPSON & KAMATA (1979) que encontraram melhor pigmentação com astaxantina esterificada. A pigmentação muscular em peixes por carotenóides é afetada pela fonte do pigmento, nível de dosificação, duração da alimentação e composição da dieta.

CHOUBER *et al.*, (1995) compararam extractos de *Phaffia rhodozyma*, astaxantina sintética e cantaxantina sintética em concentrações de 50-100mg/kg na dieta destinada a truta arco-íris, onde foram avaliados os aspectos metabólicos e digestivos, além de avaliar a cor induzida por os diferentes pigmentos, retenção e digestibilidade. Nesse estudo, os autores puderam concluir que a astaxantina sintética é melhor utilizada pela truta arco-íris em termos de pigmentação muscular e retenção, entretanto, a cantaxantina e o extrato de *Phaffia* mostraram um comportamento similar, mesmo quando a concentração utilizada do extrato de levedura foi de 50 mg/kg, além disso, apresentou a dieta contendo *Phaffia* apresentou maior digestibilidade em relação a outras testadas.

O atrativo econômico deste mercado, para além dos custos elevados devido à suplementação das dietas especialmente com carotenóides sintéticos, faz com que estes promovam a investigação nos diversos aspectos que os envolve como, por exemplo, em especial, os fatores que influenciam a pigmentação, nomeadamente a espécie, o tamanho, a idade, a composição da dieta, e a taxa de incorporação na dieta, além do seu metabolismo, os mecanismos envolvidos na sua absorção, deposição e na busca de fontes aplicáveis alternativas de pigmentos na aquicultura, mais econômicas, que contenham concentrações elevadas de pigmentos e que se apresentem com qualidade constante de produção.

2.3 Suplementação alimentar para a Carcinicultura

Em 2003, a produção mundial do camarão cultivado em mais de 50 países emergentes chegou a 1.630.000 toneladas, ou seja, 35,21% do total de camarão produzido em todo o mundo, cujo volume anual envolvendo captura e cultivo foi 4.630.000 toneladas, o que indica que o camarão extraído dos mares continua sendo o principal responsável pela oferta global do produto (64,79%). O hemisfério oriental é responsável pela maior parte da produção mundial do camarão cultivado, com 1.359.000 toneladas em 2003, correspondentes a 83,37% do total mundial, sendo o principal centro produtor o sudoeste da Ásia que inclui os seguintes países por ordem de importância: China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Índia, Bangladesh e Malásia.

Em relação ao ocidente, a produção de 2003 chegou a 271.000 toneladas, 16,63% do total mundial. O Brasil, ao finalizar o referido ano com 90.190 toneladas, consolidou a posição de líder do hemisfério, superando o Equador e o México que, tradicionalmente, ocupavam o primeiro e o segundo lugar, respectivamente. Outros países produtores incluem Colômbia, Venezuela, Peru, Panamá, Honduras e Nicarágua (ROCHA, et al., 2004).

Em 2001, foi responsável pelo aumento das exportações brasileiras no item pescado; dentre eles, o camarão representou 31% e a lagosta, 22% (SOUZA, et al, 2003).

A produção brasileira de camarão em 2002 chegou a 60 mil toneladas (Figura 3), mais de 50% a mais do que no ano de 2000.

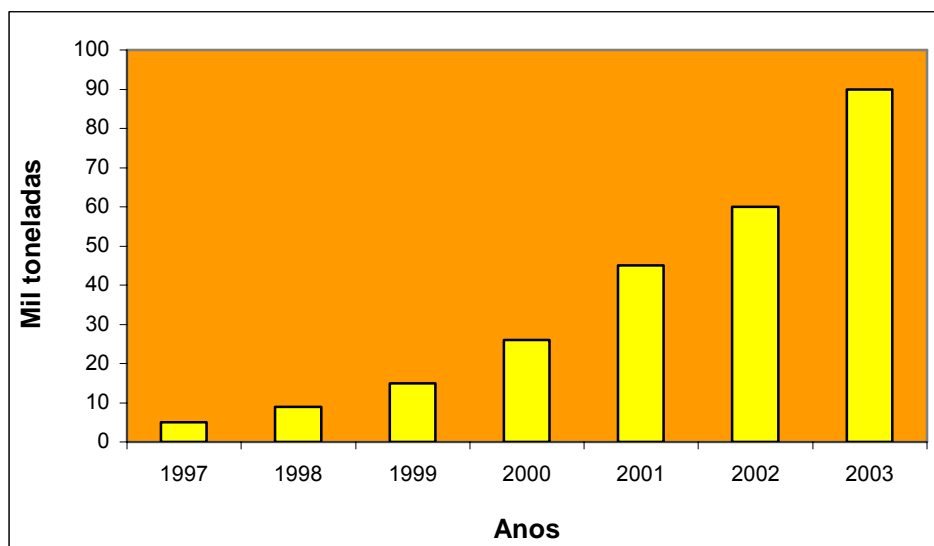


Figura 3. Produção brasileira de camarão cultivado – 1997-2002 (fonte: SOUZA et al., 2003).

Aproximadamente 96% da produção brasileira de camarão concentra-se na região Nordeste; a Região Sul representa 3% do total, impulsionada principalmente pelo estado de Santa Catarina (SOUZA et al., 2003).

A história catarinense do camarão cultivado começou em 1984, quando a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciou suas pesquisas de reprodução e cultivo do camarão-rosa (espécie nativa). Os resultados obtidos nos cultivos foram insatisfatórios e os empreendimentos foram se enfraquecendo, a produção caindo, até que, finalmente, deixaram de existir. Em 1998, após o fechamento de vários empreendimentos, a UFSC e a Epagri introduziram no estado a espécie *Litopenaeus vannamei* (camarão-branco-do-pacífico), que havia apresentado nos cultivos do Nordeste ótimas taxas de sobrevivência, conversão alimentar e crescimento. Este alto desempenho do *vannamei* viabilizou a reativação dos antigos empreendimentos e possibilitou novas instalações de cultivo (SOUZA et al., 2003).

A produção catarinense passou rapidamente de 50 toneladas em 1998, para 1.900 toneladas em 2002. A maior parte da produção do estado provém da região de Laguna, que, devagar, vai cedendo espaço para novos empreendimentos que estão surgindo no norte do estado (SOUZA, et al., 2003).

Segundo a Associação brasileira de criadores de camarão (2004), o *Litopenaeus vannamei* é, a única espécie que atualmente se cultiva no Brasil para fins comerciais. Nos últimos cinco anos, os resultados dos trabalhos realizados no processo de sua domesticação convergiram e continuam convergindo cada vez mais para a estruturação de um sistema semi-intensivo de produção que é próprio para as condições dos estuários brasileiros.

A astaxantina em sua forma livre, esterificada ou complexada com proteínas, é o carotenóide mais abundante nos crustáceos, sendo este fonte natural do pigmento para os salmónidos selvagens. Estudos têm sido realizados no que concerne à utilização de organismos como o camarão *Penaeus japonicus* (CHOUBERT & LUQUET, 1983) e como fonte pigmentante nas dietas destinadas a salmonídeos. Estes estudos demonstram resultados positivos quanto a pigmentação da carne e em graus diferentes de intensidade. Inúmeros estudos foram feitos para avaliar o uso dos produtos derivados do camarão e de outros crustáceos como a fonte pigmentante para as companhias salmoneras. BINKOWSKI *et al.*, (1993) diz que estes, a nível mundial, produzem uma grande quantidade (1000 000 000 toneladas) de resíduos (exoesqueletos e carne aderidos a este, víceras e cabeça). Muitos destes esforços foram inúteis, devido os resíduos apresentarem elevados índices de cinzas, de quitina, de umidade, de proteína e uma concentração muito variável de pigmentos (0 a 200 ppm de astaxantina), o que torna difícil a padronização destes produtos e conseqüentemente a incorporação destes nas dietas industriais destinadas a salmonídeos (TORRISEN *et al.*, 1989).

Estudos recentes demonstram o sucesso de pigmentação em animais como nos camarões brancos, *Litopenaeus vannamei* utilizando-se fontes naturais de carotenóides (PONCE-PALAFIX *et al.*, 2006). Nestes estudos, os autores afirmam que existem fontes promissoras de carotenóides para a alimentação destes animais, nomeadamente, a levedura *Phaffia rhodozyma*, as microalgas *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* e *Spirulina spp.*, pétalas de flores *Adonis aestivalis* e *Tagetes*, a pimenta roxa *Capsicum annum* e a leguminosa *Leucaena leucocephala*. Os carotenóides provenientes destas fontes são incluídos na alimentação em concentrações que variam entre 100 a

450 mg/kg na dieta dos camarões. No caso particular do camarão *L. vannamei* tem se notado um aumento marcante de carotenóides no exoesqueleto e no abdômem quando este alimenta-se com dietas suplementadas com extratos de plantas, microalgas ou leveduras, como as mencionadas acima, sugerindo que carotenóides como a zeaxantina, a luteína e a capsantina estão sendo convertidos em astaxantina. A via metabólica dos carotenóides nos camarões pode ser vista na Figura 4 (LATSCHA, 1991).

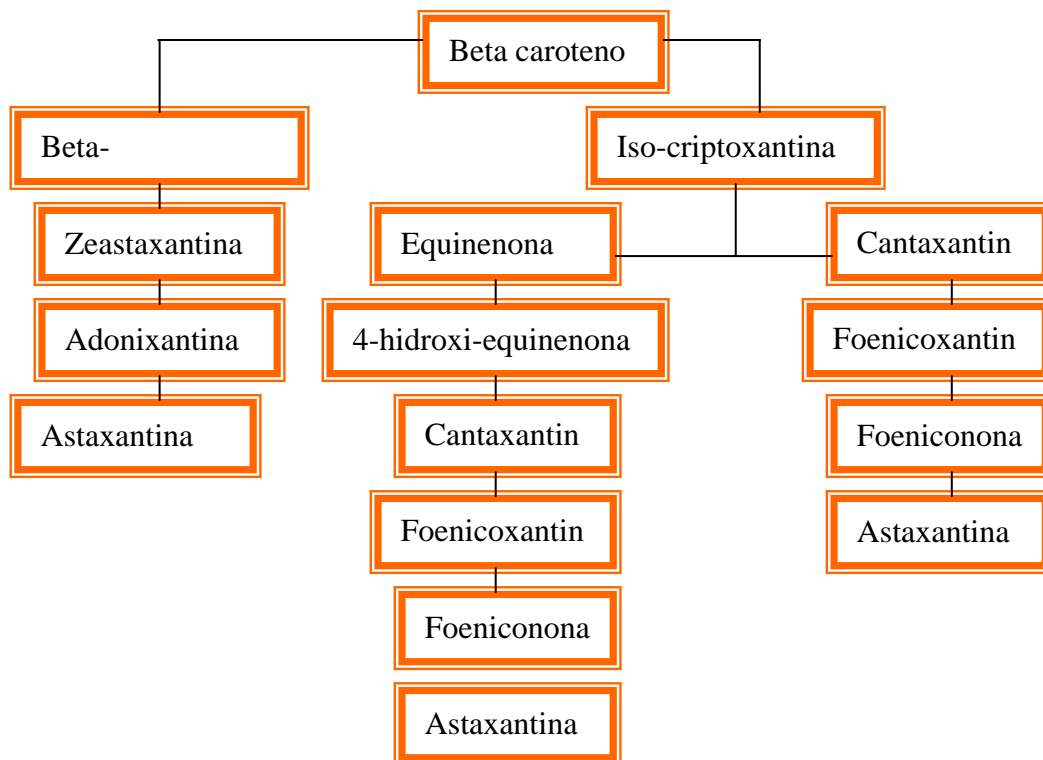


Figura 4. Via metabólica de carotenóides em camarões (LATSCHA, 1991)

Camarões bancos como o *L. vannamei* foram alimentados com dietas ricas em carotenóides provenientes de extratos de pimenta roxa (ARREDONDO-FIGUEROA et al, 2003). Neste estudo o efeito pigmentante destes carotenóides foi comparado com a fonte actualmente utilizada (astaxantina sintética -Carophyll Pink®). Os camarões alimentados com a dieta, contendo 250 mg/kg de carotenóides esterificados provenientes da fonte natural mostraram uma maior pigmentação do exoesqueleto e ligeiramente

No final de 2003, o mercado europeu de carotenóides contabilizou um total de US\$ 348,5 milhões, sendo as previsões para 2010 de até US\$ 419,6 milhões. O mercado de astaxantina, embora menor que o de licopeno e β -caroteno, tem crescido rapidamente, sendo previsto um aumento da sua participação no mercado de 26% entre 2000 e 2010. O segmento de aditivos de alimentação animal será o mais lucrativo até o ano de 2010, seguido pelo de suplementos e alimentos fortificados (NUTRAINGREDIENTS, 2005).

A cantaxantina, tradicionalmente usada para dar a cor vermelha para a gema do ovo, está se tornando popular para pigmentar peixe e passa a ocupar uma parte do mercado da astaxantina.

A luteína, nos últimos anos, destaca-se pelos benefícios relacionados com a saúde da visão. Antes do fim da década de 1990 a luteína era usada principalmente para colorir gema de ovo e carne de frango. A partir de 2000, uma nova aplicação da luteína desenvolve-se, na forma de suplemento, para prevenir a doença da degeneração macular. Esta nova aplicação levou o mercado da luteína para mais de 139 milhões de dólares em 2004, comparado com 64 milhões em 1999.

O licopeno também teve um substancial crescimento nos últimos anos devido aos seus benefícios para a saúde. A zeaxantina, que atua sinergisticamente com a luteína, também cresceu a partir de um baixo nível de comercialização.

O atrativo econômico destes mercados, além dos altos custos devido a suplementação das dietas destinada a animais contendo carotenóides, especialmente os sintéticos, tem propiciado que os temas a investigar se centrem principalmente na abordagem de aspectos como o conhecimento dos fatores que influem na pigmentação (espécie, tamanho, idade, composição da dieta, taxa de incorporação na dieta), seu metabolismo, os mecanismos envolvidos na sua absorção, deposição e nas fontes alternativas de concentrações elevadas de pigmentos e que apresentem qualidade constante.

2.5 Métodos analíticos aplicados em estudos de carotenóides

2.5.1 Extração

Carotenóides são solúveis em lipídios ou em solventes apolares, exceto quando estes fazem complexos com proteínas e açúcares.

Os solventes apolares mais utilizados para a extração de carotenóides são o éter de petróleo e o éter etílico. Há outros, mas, no entanto, apresentam muitas desvantagens como serem inflamáveis, tóxicos e degradarem rapidamente os carotenóides. Outros solvente menos apolares como acetona, metanol e etanol também são utilizados para extração, porém apenas são bons extratores quando se trata das xantofilas (RODRIGUES-AMAYA, 1997).

Em geral, a extração dos carotenóides deve ser feita rapidamente, a fim de se evitar o contato com a luz, oxigênio e altas temperaturas, tudo isso para se minimizar a degradação destes compostos.

Segundo alguns autores (RODRÍGUEZ-AMAYA 1989,1990; RODRÍGUEZ-AMAYA Y AMAYA-FARFAN 1992), são diversos os pontos a serem levados em consideração quando se programa uma extração de carotenóides, tais como:

- existem muitos carotenoides de origem natural
- A composição dos carotenóides nos alimentos varia tanto qualitativamente como quantitativamente,
- Os carotenóides têm uma predisposição a isomerização e oxidação

Portanto, eh provável que ocorram problemas ao separar, identificar e quantificar as amostras.

O fator limitante das técnicas que utilizam organossolventes está na presença de resíduos de solventes de extração nos extratos e no produto final. Sendo assim, o uso de pigmentos naturais que sejam extraídos por solvente

torna-se pouco viável à medida que o que se busca justamente é algo mais saudável.

A extração supercrítica é uma técnica de separação em que o solvente é um fluido supercrítico, cujo o poder de dissolução pode ser regulado através do controle da pressão e da temperatura (PAULAITIS *et al.*, 1983).

Um grande número de solventes orgânicos utilizados no processo tradicional de extração são tóxicos e de difícil remoção dos extratos, o que tem conseqüências negativas nomeadamente no setor alimentar, farmacêutico e cosmético. A exigência legal e regulamentar ao nível quer da produção, quer da comercialização de produtos extraídos com aqueles solventes não tem parado de aumentar.

Segundo algumas diretrizes de sobre o uso de solventes para a extração de alimentos, os solventes não devem apresentar resíduos prejudiciais a saúde humana. Os habitualmente utilizados são o propano, o butano, o acetato de etila, o etanol, o dióxido de carbono, o óxido nitroso e a acetona. Alguns produtos apresentam diretrizes específicas, como o caso dos óleos e gorduras onde é utilizado o hexano e do café onde é utilizado o diclorometano para a descafeinação e para a remoção de substâncias amargas do café e dos chás.

Um método convencional é a extração com solventes orgânicos, principalmente acetona. Alguns dos problemas desse método incluem o tempo excessivo e a alta temperatura requerida para remover o solvente remanescente no produto.

Uma das alternativas a esta técnica é o processo de extração com fluido supercrítico. Fluidos supercríticos exibem propriedades físico-químicas intermediárias às de um líquido e um gás, o que aumenta sua eficácia como solvente. Sua densidade relativamente alta confere bom poder de solvência, enquanto seus valores de difusividade alto e viscosidade baixo proporcionam poder de penetração apreciável na matriz do soluto (RIZVI, *et al.*, 1986).

Vários estudos têm demonstrado que é vantajoso usar fluidos supercríticos, particularmente o dióxido de carbono (CO₂). Algumas vantagens do CO₂ é ser atóxico, não inflamável, não corrosivo e facilmente removido dos produtos extraídos. Sua pressão crítica é moderada (73 atm), o que diminui os custos de compressão. Sua temperatura crítica é relativamente baixa (31°C), possibilitando a extração de compostos instáveis termicamente (HAWTHORNE, 1990).

A aplicação comercial da extração supercrítica foi iniciada em 1978, com a extração da cafeína do café e a extração de lúpulo. Hoje em dia, são inúmeras as aplicações da extração supercrítica. Como exemplos, mencionam-se (BERNARDO-GIL, RIBEIRO, ESQUIVEL, 2002):

- Descafeinação de café, chá, cacau.
- Extração de lúpulo.
- Extração de aromas, antioxidantes e outras substâncias activas de várias partes das plantas (alecrim, segurelha, coentro, tomilho, orégão, murta, cidreira, etc.).
- Extração de corantes naturais (por exemplo, β-caroteno).
- Eliminação de óleo de batatas fritas.
- Extração de frações lipídicas de sementes.
- Desodorização de óleos e de gorduras animais e vegetais.
- Extração de esteróis (estigmasterol, colesterol, etc.).
- Extração de esteróides (mevinolina, efrotomicina de fermentações, etc.).
- Extração de alcalóides (nicotina e nitrosaminas do tabaco, lupanina e lupinina do tremçoço, etc.).
- Separação de produtos de reacções, ou de compostos presentes em soluções diluídas, como por exemplo etanol obtido por fermentação.
- Extração fraccionada de aromas, polímeros, fármacos, glicéridos contidos em gorduras de peixe, óleo de fígado de bacalhau, manteiga ou óleos já usados.
- Extração de produtos de elevado valor acrescentado (por exemplo, ácido eicosapentanóico, ácido γ-linolénico) de algas ou de sementes.
- Extração de agentes bioestáticos indesejáveis de fermentações.

- Tratamento de extractos obtidos por processos tradicionais para obtenção de produtos de maior pureza, através da extracção de solventes residuais (etanol, hexano, cloreto de metileno, etc.).

- Remoção de compostos poluentes de águas residuais.
- Extração / detecção de DDT's e PCB's e outros organoclorados de solos, sedimentos e músculo de peixe.
- Regeneração de catalisadores e adsorventes

Os líquidos supercríticos estão substituindo cada vez mais os solventes orgânicos que são usados em operações industriais de purificação e de recristalização por causa das pressões regulatórias e ambientais sobre as emissões poluentes. Os processos baseados em líquidos supercríticos ajudaram a eliminar o uso do cloreto, do hexano e do metileno como solventes. Com a diminuição crescente do uso de solventes orgânicos nos produtos farmacêuticos, em produtos médicos, e em neutraceuticals, e com regulamentos mais restritos em emissões de poluentes, o uso da extração supercrítica proliferou rapidamente em todos os setores industriais.

O CO₂ apresenta vantagens significativas para ser usado como fluido supercrítico. Por outro lado, como tem uma temperatura crítica de 304,25K, pouco acima da temperatura ambiente, pode ser usado na extração de produtos biológicos, farmacêuticos e alimentares degradáveis pelo calor associado a outros processos de separação (TAYLOR, 1996).

O CO₂ apresenta como vantagens (BERNARDO-GIL, RIBEIRO, ESQUIVEL, 2002):

- Não cria problemas ambientais
- Não é tóxico nas quantidades utilizadas (o que o torna particularmente adequado na indústria alimentar).
- Não se inflama.
- Existe em larga disponibilidade.
- É barato em purezas elevadas quando comparado com outros solventes.
- É praticamente inerte sob o ponto de vista químico.
- Não são, normalmente, necessários processos subsequentes de limpeza dos extractos.

- É facilmente separado do produto que se pretende extrair através da alteração das condições de pressão e temperatura de modo que seja gasoso nessas condições.

- Pode ser utilizado a temperaturas moderadas (geralmente inferiores a 50 °C), o que o torna indicado quando existe perigo de degradação térmica no caso de extractos particularmente delicados.

- O oxigénio é eficientemente eliminado da matriz do soluto, prevenindo, assim, oxidações e reações de auto-oxidação.

Os fluídos supercríticos têm propriedades que os tornam solventes únicos. O seu poder solvente é tanto maior quanto maior for a densidade, a qual aumenta com a pressão para uma dada temperatura. Quando atingem densidades próximas da dos líquidos, terão um poder solvente comparável a estes, tendo ainda a vantagem das suas viscosidades e difusividades dos fluídos supercríticos serem menores e maiores, respectivamente, que as dos líquidos poderá conduzir a uma maior eficiência da extração supercrítica, em comparação com a extração com solventes. Uma vantagem adicional dos fluídos supercríticos residirá no fato da sua tensão superficial ser muito pequena, o que facilitará a penetração destes solventes em estruturas microporosas.

A escolha de um fluído supercrítico terá de atender ao tipo de produto a ser extraído, à sua sensibilidade ao calor, à solubilidade e à seletividade apresentadas e ainda ao preço. Por outro lado, a opção estará determinada pelas restrições legais ao uso de solventes em alimentos, fármacos, cosméticos etc. O Fluido supercrítico mais utilizado, de longe, é o dióxido de carbono. Outros solventes têm sido empregues tais como o etileno, o etano e o óxido nitroso, mas só este último é permitido em produtos alimentares.

Com o objetivo de aumentar a solubilidade e/ou a seletividade pode ser adicionado ao fluido supercrítico um composto com pressão de vapor intermediária entre a dele e do produto a ser extraído. Estes compostos promotores da solubilidade são referidos na literatura como “entrainers” (BRUNNER E PETER, 1982) e também como cossolventes.

Qualquer que seja o método escolhido, é essencial que se tome precauções para evitar transformações e perdas quantitativas dos carotenóides durante as análises. Estas incluem (SCHIEDT AND LIAAEN-JENSEN 1995):

- completar as análises o mais brevemente possível.
- usar solventes de pouca reactividade ou destilados, livres de impurezas
- proteger da luz
- excluir oxigênio
- evitar altas temperaturas

Além disso, pode-se utilizar antioxidantes e agentes neutralizantes quanto a análise for prolongada.

2.5.2 Separação e Identificação

A separação destes compostos em geral dá-se por métodos cromatográficos, como por exemplo a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e a cromatografia de Alta Eficiência (HPLC – do inglês *High performande liquid chromatography*). A CCD é uma técnica ainda amplamente utilizada devido principalmente suas principais características que são: baixo custo e simplicidade. Já o HPLC é a técnica de coluna preferida, visto que esta apresenta duas vantagens: o fato de ser qualitativa e quantitativa ao mesmo tempo. Esta técnica é ideal para carotenóides, uma vez que estes compostos podem ser monitorados facilmente por detectores UV-visível. Um dos fatores que tem contribuído ainda mais para os estudos de carotenóides é o fato de acoplar detectores do fotodiodo, os quais permitem a detecção de mais de um comprimento de onda. Em geral a técnica de Cromatografia de Alta Eficiência apresenta as seguintes vantagens sobre as demais técnicas: alta sensibilidade, resolução, reprodutibilidade e rapidez nas análises (TAYLOR, 1988).

A técnica mais amplamente usada para análises de carotenóides é a espectroscopia UV-visível, a qual dá a informação da presença de anéis, grupos carbonilas e efeitos isoméricos. Nesta análise, a absorvância máxima, a forma e a estrutura do espectro são as características de moléculas cromóforas.

3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIBA Y, SATO K, TAKAHASHI K, MATSUSHITA K, KOMIYAMA H, TSUNEKAWA H, NAGAO H. Meat color modification in broiler chickens by feeding yeast *Phaffia rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin. **Journal of Applied Poultry Research** 10:154-161, 2001.

AKIBA, Y. *et al.* Availability of cell wall-fractured yeast, *Phaffia rhodozyma*, containing high concentration of astaxanthin for egg yolk pigmentation. **Animal Science Journal**, v. 71, n. 3, p. 255-260, 2000.

ANONIMO, SIGMA ALDRICH. Disponível em. <https://www.sigmaaldrich.com>, acesso em 23-08-2006

ARREDONDO-FIGUEROA, J. L.; PEDROZA-ISLAS, R., PONCE-PALAFIX, J. T. ANS VERNON-CARTER, E. J. Pigmentation of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*, BOONE 1931) With esterified and saponified carotenoids from Red Chili (*Capsicum annum*) in Comparison to astaxanthin. **Revista mexicana de ingeniería química**, 2, 101-108, 2003.

BAUERNFEIND, J. C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, n.3, p.456-473, 1972.

BERNARDO-GIL, G., RIBEIRO, M., ESQUÍVEL, M.M. Produção de extractos para a indústria alimentar: uso de fluidos supercríticos. **Boletim de Biotecnologia**, 73, pp14-21, 2002.

BINKOWSKI, F.P., SEDMAK, J. J., JOLLY, S. O. An evaluation of *Phaffia* yeast as a pigment source for salmonids. **Aquaculture Magazine** March/April, 54-59, 1993

BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Carotenoids today and challenges for the future. In: _____. Carotenoids. Berlin: Birkhäuser Verlag, p. 13-26, 1995.

BRUNNER, G. & PETER, S. On the solubility of Glycerides and fatty acids in compressed gases in the presence of an entrainer. **Separation Science and Technology**, 17: 199 – 214., 1982.\

CARVALHO, P.R., PITA, M.C.G., PIBER-NETO, E., MIRANDOLA, R.M.S, MENDONCA-JUNIOR, C.X. Influência da adição de fontes marinhas de carotenóides à dieta de galinhas poedeiras na pigmentação da gema do ovo. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 43, n. 5, p. 654-663, 2006

CHOUBERT, G. E HEINRICH, O. Carotenoid pigments of the green alga *Haematococcus pluvialis*: Assay on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, pigmentation in comparison with synthetic astaxanthin and canthaxanthin. **Aquaculture**, 112, 217-226, 1993.

CHOUBERT, G., LUQUET, P. Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) pigmentation. Influence of fat content of the diet. **Aquaculture**. 32, 19-26, 1983

CHOUBERT, G., MILICUA, J.-C. G., GOMEZ R., SANCE S., PETIT, H., NEGRE-SADARGUES, G., CASTILLO, R., TRILLES, J.-P. Utilization of carotenoids from various sources by rainbow trout: muscle colour, carotenoid digestibility and retention. **Aquaculture International** 3, 205-216, 1985.

DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press. v. 2, p. 39-165, 1976.

DELGADO-VARGAS, F., JIMENEZ, A.R. & PAREDES-LOPEZ, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and Betalains – Characteristics,

Biosynthesis, Processing and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 40 (3) 173-289, 2000.

FAVERET FILHO, P. & SIQUEIRA, S. H. G. Panorama da Pesca Marítima no Mundo e no Brasil. In: <http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/rspesca.pdf>. Acesso em **07/04/2007**.

FOSS, P. STOREBAKKEN, T, AUSTRENG, E E LIANNEN-JENSEN, S. Carotenoids in diets for salmonids. V. Pigmentation of rainbow trout and sea trout with astaxanthin and astaxanthin dipalmitate in comparison with canthaxanthin. **Aquaculture**, 65, 293-305, 1987.

FRASER, P.D., MIURA, Y., & MISAWA, N. In vitro characterization of astaxanthin biosynthetic enzymes. **Journal of Biological Chemistry** ,272 ,6128 –6135, 1997.

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

GOUVEIA, L. GOMES, E., EMPIS, J. Potential use of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. **Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung** 202, 75-79., 1996a.

GOUVEIA, L. GOMES, E., EMPIS, J. Use of *Chlorella vulgaris* in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), diets to enhance muscle pigmentation. **Journal of Applied Aquaculture** 7, 61-70, 1996b.

GOUVEIA, L., RAYMUNDO, A., BATISTA, AP., SOUSA, I., EMPIS, J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **Eur Food Res Technol** 222: 362–367, 2006.

HAWTHORNE, S. B. - Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction. **Analytical Chemistry**, 62 (11) : 633-42, 1990.

HOSAN, K. **Extração de Pigmentos Carotenóides a Partir de Resíduos do Processamento de Camarões (*Farfantepenaeus paulensis*)**. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, 63p, 2002.

JOHNSON, E. A., AN, G.-H. Astaxanthin from microbial sources. **Crit. Rev. Biotechnol** 11(4), 297-326, 1991.

JOHNSON, E. A.; CONKLIN, D. E.; LEWIS, M. J. Yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 34, n. 12, 2417-2421, 1977.

JOHNSON, E. A.; LEWIS, M. J.; GRAU, C. R. Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Poultry Sciences**, Champaign, v. 59, p. 1777-1782, 1980.

KHACHIK F. *et al.* Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 40:390-8, 1992.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 66, n. 5, p. 1003-1010, 1994.

LATSCHA T. Carotenoids — Their Nature and Significance in **Animal Feeds**. Basel: F. Hoffman-LaRoche Ltd, 1990.

LIU ,B.H. , & LEE, Y. K. Composition and biosynthetic pathways of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorococcum* sp. **Biotechnology Letters** , 21 ,1007 –1010, 1999.

MARKET FORECAST. Biopigments: biotech pigments poised to challenge synthetic colors; biopigment market could reach \$350 million by 2000. **Industrial Bioprocessing**, may, 1992.

MARUSICH, W. L.; BAUERNFEIND, J. C. Oxycarotenoids in poultry feeds. In: BAUERNFEIND, J. C. (Ed.). **Carotenoids as colorants and vitamin A**

precursors: technological and nutritional applications. New York: Academic Press, 1981. p. 319-462.

MCCOY, M. Astaxanthin market a hard one to crack. **Chemical and Engineering News**, v. 77, n. 14, p. 15-17, 1999.

MIDDLETON EM, TERAMURA AH The role of flavonol glyco-sides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. **Plant Physiol** 103: 741–752, 1993.

MORIEL, D.G., CHOCIAI, M., MACHADO, I.M.P., FONTANA, J. D., BONFIM, T.M.B. Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. Braz. arch. biol. technol. vol.48 n.3. p. 397-401, 2005

NUTRAINGREDIENTS. Europe's health food industry has 'under-utilized' the nutraceutical properties of carotenoids and consumers are still unaware of their health benefits, finds a new report on the \$348.5 million (€291.4m) carotenoid market. Disponível em: <<http://www.nutraingredients.com/news/news-NG.asp?n=48112-carotenoids-untapped-potential>>. Acesso em: 07/04/07.

PAULAITIS, M. E., PENNIGER, J. M. L, GRAY, JR. R. D.DAVIDSON, P., Chemical Engineering at Supercritical Fluid Conditions, **Ann Arbor Science Publisher** (1983).

PONCE-PALAFOX, J.T., ARREDONDO-FIGUEROA, J.L., VERNON-CARTER, E.J. Carotenoid from plants used in diet for the culture of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Revista Mexicana de ingeniería química**, 5, 157-165, 2006.

RICHIE, F. C. e MARTINS MORAES, J. E. REVISTA DO BNDES, Rio de Janeiro, V. 13, N. 26, P. 309-314, DEZ. 2006

ROCHA, I. P. RODRIGUES, j., AMORIN, L. A carcinicultura Brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, 2004. N.2, Março, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. AND J. AMAYA-FARFAN Estado actual de los métodos analíticos para determinar provitamina A. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 42:180-191. 1992.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoides y preparacion de alimentos: La retencion de los carotenóides provitamina A em alimentos preparados, procesados y almacenados, **OMNI**, 1-105, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **J. Micronutr. Anal.** 5:191-225. 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Provitamin A determination. Problems and possible solutions. **Food Nutr. Bull.** 12:246-250. 1990.

SCOTT, K.J, HART, D.J. The carotenoid composition of vegetables and fruit commonly consumed in the UK. Norwich: IFR; 1994.

SIMPSON, KL & KAMATA, T. Use of carotenoids in fish feeds. In: **Finfish Nutrition and Fishfeed Technology** (Halver, JE & Thiews, K. eds.), Vol 2, pp. 415–424, 1979.

SOUZA FILHO, J.; COSTA, S. W. da; TUTIDA, L. M.; FRIGO, T. B.; HERZOG, D. *Custo de produção do camarão marinho*. Ed. rev. Florianópolis: Instituto Cepa/SC/Epagri, 2003. 24p. (Cadernos de Indicadores Agrícolas, 1). **Camarão marinho – Custo de produção-SC**. 2003.

SYLVIA, G., MORRISSEY, M. T., GRAHAM , T., GARCÍA, S. Organoleptic qualities of farmed and wild salmon. **J. Aquat. Food Prod. Technol.** 4, 51-64, 1995.

SYLVIA, G., MORRISSEY, M. T., GRAHAM, T., GARCÍA, S., Changing trends in seafood markets: the case of farmed and wild salmon. **J. Food Prod. Market.** 3, 49-63, 1996.

TAYLOR, L. **Supercritical Fluid Extraction.** Ed. Wiley inter science. New York. 1996.

TORRISSEN, O. J., HARDY, R. W., SHEARER, K. D. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. **Reviews in Aquatic Sciences.** 1, 209-225, 1989.

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

VAZQUEZ, M.; SANTOS, V. 3-hydroxy-3',4'-didehydro-beta-psi-caroten-4-one (HDCO) from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) cultivated on xylose media. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 2, p. 181-182, 1998.

WISSGOT, U., AND BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology.** 7, 298-302, 1996.

ZHANG, D.H., LEE, Y.K., NG, M.L., & PHANG, S.M. Composition and accumulation of secondary carotenoids in *Chlorococcum* sp. **Journal of Applied Phycology**, 9, 147-155, 1997.

ASTAXANTHIN FROM THE YEAST *Phaffia rhodozyma*.
SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AND ORGANIC SOLVENTS
EXTRACTION

Artigo publicado na Revista *Journal of Food technology*, 4 (1), 59-63,
2006

Astaxanthin from the Yeast *Phaffia rhodozyma*. Supercritical Carbon Dioxide and Organic Solvents Extraction

¹Renata Passos, ¹Luís Beirão, ²António Palavra, ³Rui Mendes, ³Beatriz Nobre and ³Luisa Gouveia

¹ Departamento de Ciência dos Alimentos, UFSC, Avenida Ademar Gonzaga, 88034, SC, Brasil

² Departamento de Engenharia Química, IST, Avenida Rovisco Pais, 1096-001, ³ Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial- INETI. Estrada do Paço do Lumiar, Edifício G, 1649-038 Lisboa, Portugal

Abstract: Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* was carried out, for several experimental conditions, using a semi-continuous apparatus. The yeast was previously freeze-dried and ground with a ball mill. The effects of the pressure (200 and 300 bar), temperature (40, 50 and 60°C) and supercritical solvent superficial velocities of 1.2 and 2.4 cm min, as well as the use of ethanol, as co-solvent (10 mol %), on the extraction efficiency were assessed. Organic solvent extractions, using acetone, dimethyl sulfoxide (DMSO) and a mixture of methanol and dichloromethane, were also carried out on whole and ground cells. The extraction with acetone of astaxanthin from ground *Phaffia* led to the highest yield. Supercritical extraction was compared with the organic extraction, and the highest recovery (75%) was achieved at the pressure of 300 bar, the temperature of 40°C and using ethanol as co-solvent. The lowest recovery of supercritical extraction was obtained at the pressure of 200 bar and the temperature of 50°C, without co-solvent. Moreover, the extraction yield increased with the pressure at constant temperature. On the contrary, the increase of temperature at constant pressure led to a decrease of the yield at 200 bar and to a slight decrease at 300 bar. Furthermore, the yield decreased with the flow rate.

Key words: Carbon dioxide, astaxanthin, yeast, *Phaffia rhodozyma*

INTRODUCTION

Astaxanthin is the carotenoid responsible by the orange-red colour of many living organisms, widely distributed in the animal kingdom, in particular marine seafood, such as salmonid fishes (trouts and salmon) and crustaceans (shrimps and lobsters). The high conjugated carbon-carbon double bonds give to astaxanthin unique properties, such as colourant and antioxidant. Astaxanthin is the highest potent antioxidant (super vitamin E) and the association of carotenoid intake and the reducing risk of certain cancers and cardiovascular diseases^[1,2], as well as atherosclerosis, cataracts, macular degeneration^[3] and enhancing of the immune resistances to viral, bacterial, fungal and parasitic infections. In fact, it has been used in the development of new attractive food industry products, with an important impact on new market niches (e.g. beverages, oil-in-water emulsions^[4], soybean oil stability^[5] as well other nutraceutical and pharmaceutical applications. Moreover, the main application of astaxanthin is still in marine fish farming.

This high astaxanthin consumption all over the world and the tendency to replace artificial (synthetic) by natural one, has led to explore the capacity of producing

astaxanthin in large scale, through microorganisms, namely the microalgæ *Chlorella vulgaris*^[6], *Chlorella zofingiensis*^[7], *Haematococcus pluvialis*^[8], the yeast *Phaffia rhodozyma*^[9] and the marine bacteria *Agrobacterium aurantiacum*^[10].

For many applications in food and health areas, there is an increase of legal restrictions to the use of toxic organic solvents. So, it is important to obtain the carotenoids, for those purposes, free of such solvents. SFE with carbon dioxide is an appropriate technique for this goal, and there are several works in this field for the separation of carotenoids from plants^[11] and microalgæ^[12-15] of astaxanthin from crustaceans^[16-17] and from the red yeast *Phaffia rhodozyma*^[18].

The aim of this study is to study the potential of *Phaffia rhodozyma* as astaxanthin producer, using organic solvents and supercritical CO₂ to evaluate the extraction yields obtained from several experimental conditions.

MATERIALS AND METHODS

The yeast *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) ATCC 24202 used in this study was cultivated and offered by the Laboratory of Enzimology

Corresponding Author: Luisa Gouveia, Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial - INETI. Estrada do Paço do Lumiar, Edifício G, 1649-038 Lisboa, Portugal Tel: +351 21 7127210 Fax: +351 21 7127195

and Technology of Fermentation, Paraná Federal University, Brasil.

The freeze dried cells of the yeast *Phaffia rhodozyma* were extracted by organic solvents: acetone, a mixture of dichloromethane and methanol (50:50 v/v) (DiCl:MeOH) and Dimethyl Sulfoxide (DMSO), on whole and ground cells (obtained with a ball mill), and by SFE with CO₂ at different experimental conditions.

Approximately 100 mg of biomass were used for carotenoids extraction tested by four different methods:

- Acetone method: 10 mL acetone was added to the dry biomass, vigorously homogenized (vortex for 1 min, twice). The mixture was centrifuged and the pellet was re-extracted with further 10 mL portions of acetone until complete extraction, which was evaluated by the absence of colour in the solvent⁽⁶⁾.
- DiCl:MeOH: 10mL dichlorometane:methanol 50:50 (v/v) were added to the dry yeast using the same method as mentioned above.
- DMSO: after the addition of 2 mL DMSO solvent, dry yeast samples were stored for 30 min. Then, 6mL of acetone were added, homogenized and centrifuged (3.500 rpm, 5 min). The pellet was re-extracted until complete pigments extraction. 10mL NaCl solution (20%) and 10mL petroleum ether (40-60°) were added to the collected solvent extractions, filtered under anhydrous Na₂SO₄, and make up to mark 25 mL with petroleum ether (40-60°), as described by Moriel *et al.*,⁽¹⁸⁾.
- Acetone plus glass balls: dry biomass was submitted to extraction with small portions of acetone 6mL, with 425-600 µm glass balls 2mL alternately in an ice bath and in a vortex agitation 1 min, until no colour was obtained.

All extractions with the yeast were done in triplicate.

The SFE was carried out in a semi-continuous apparatus already previously described⁽¹²⁾.

The liquid CO₂ (99.998 % purity) from a cylinder was compressed to the working pressure using a metering pump. The pressure was controlled by a back-pressure regulator and the fluid, before reaching the extractor 5 cm³, passed through a coil immersed in the water bath. After flowing through the yeast bed, contained in the extractor, the supercritical fluid was expanded to atmospheric pressure through a three-way valve and the solutes were collected, in cooled glass U-tubes filled with glass wool. Gas flow rate was monitored with a rotameter and the total volume of gas was measured with a wet test meter.

At the end of each run, the extracted carotenoids were collected washing the glass wool, the inside of the

three-way valve and the expansion tubing with the acetone.

Fractions of 5 to 20 L of expanded gas were collected along time.

The supercritical CO₂ extractions were done at different experimental conditions, on two grams of ground freeze-dried *P. rhodozyma*, in order to study the effect of pressure (200 and 300 bar), temperature (40°, 50° and 60°C), CO₂ superficial velocity (1.2 and 2.4 cm min⁻¹), as well as the effect of co-solvent (ethanol 10%) on the extraction efficiency.

Reversed-phase analysis of extracts was performed on a HPLC (Perkin Elmer) with a Vydac column (201TP54, 250mm/4,6mm) and a detector UV/VIS Waters 481 (λ=477 nm), with acetonitrile:methanol (10:90v/v), as eluent. The pigments were eluted over 20 min with a flow rate of 1mL min⁻¹.

In order to determine the amount of astaxanthin a calibration curve was obtained using an astaxanthin standard (Sigma, 98% purity).

Total carotenoids concentration was determined, in astaxanthin equivalents, by comparing total and astaxanthin areas.

RESULTS AND DISCUSSION

Supercritical fluid extraction: Using CO₂ as supercritical solvent, the extraction yield increased with pressure, at constant temperature, and decreased with temperature, at constant pressure, as can be seen in Fig. 1. The solubility of the solutes is influenced by two factors: the density of the solvent, which increases with the pressure at constant temperature and the vapour pressure of the solutes, which increases with the temperature, at constant pressure. The solubility will change according to the predominant factor. At 300 bar, for this system, the initial yields are about the same (the curves almost overlap), for the three studied temperatures.

Figure 2 shows the effect of the presence of ethanol, as co-solvent, and it shows that it increases the SFE yield. The improve in yield (about 25%) by the ethanol can be due to two effects: the increase of astaxanthin solubility in supercritical CO₂ plus co-solvent, due to the polar character of the carotenoid, which eases the formation of hydrogen bonds with CO₂ and the swelling of the biomass pores easing the release of astaxanthin⁽¹⁹⁾.

The effect of the solvent flow rate is shown in Fig. 3 and it can be verified that the yield decreases with the superficial velocity. Although, initially, the curves almost overlap, meaning that the extraction of astaxanthin more accessible is carried out at almost equilibrium conditions. However, near the plateau zone it seems that resistance to internal mass transfer is predominant.

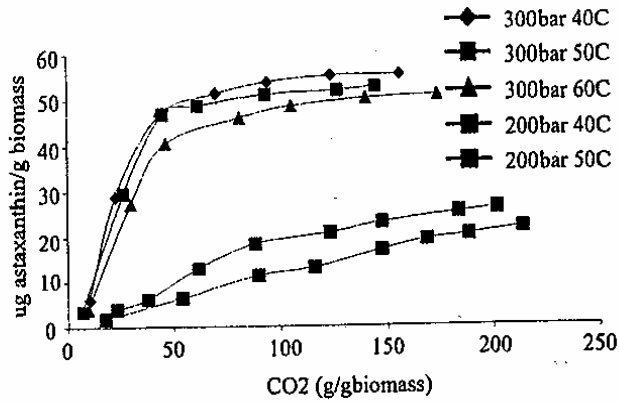


Fig. 1: Effect of pressure and temperature on Supercritical CO₂ Extraction of astaxanthin from the yeast *Phaffia rodozyma*

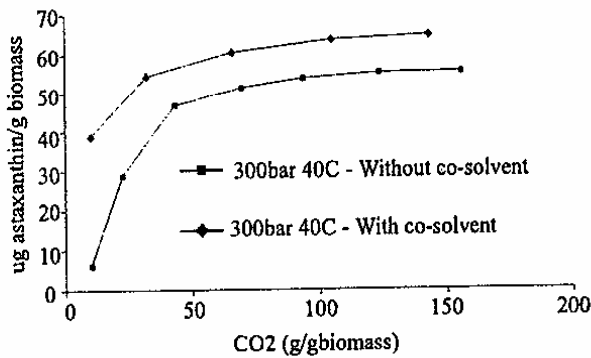


Fig. 2: Effect of the co-solvent ethanol (10%) on Supercritical CO₂ Extraction of astaxanthin from the yeast *Phaffia rodozyma*

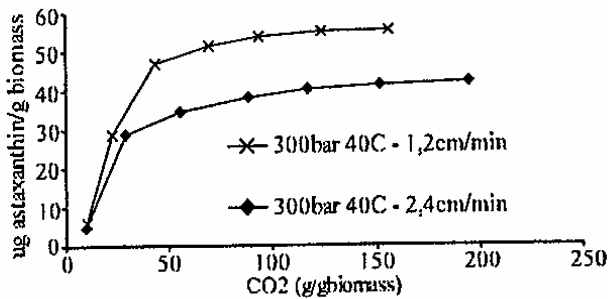


Fig. 3 Effect of the flow rate (superficial velocity) of supercritical CO₂ in SFE of astaxanthin from the yeast *Phaffia rodozyma*

Comparison between organic solvent and supercritical fluid extraction: Figure 4 shows the total carotenoids extractions by the organic solvents used and the highest yield (μg astaxanthin/g dry biomass) was obtained with acetone+glass balls, for both whole and ground cells, followed by (DiCl:MeOH). Furthermore, the acetone was efficient only for ground cells, while the yield for DMSO

was similar for both whole and ground cells and lower than that obtained with acetone, since DMSO and methanol are able to break the cellular wall of the yeast.

The highest yield obtained with acetone+glass balls is probably due to the increase of disrupted cells as a consequence of the physical effect of the balls (breaking the cell wall and the carotene-proteins bonds)⁽²⁰⁾.

With supercritical extraction using pure CO₂ at 300 bar and 40°C, it is possible obtaining 85 % of carotenoids (recoveries compared with the yield before mentioned obtained with acetone plus glass balls), while with CO₂ mixed with the co-solvent, at the same conditions of pressure and temperature, the recovery is higher than 100 % (Fig. 5).

Figure 6 shows that the best yield of astaxanthin by organic solvents was obtained using acetone+glass balls, followed respectively by (DiCl:MeOH), acetone and DMSO. The reason for this behaviour is probably the same as above. On the other hand, the lowest value of acetone+glass balls for the whole cells is probably due to less free astaxanthin available, when the cells are not broken.

With supercritical extraction (Fig. 7), the highest recoveries of astaxanthin, 63 and 72 %, were obtained at the pressure of 300 bar and temperature of 40°C, without and with the co-solvent, respectively. These values are lower than those obtained for the total carotenoids; so, some degradation of astaxanthin must have occurred. Lim *et al.* obtained recoveries of carotenoids and astaxanthin, at 40°C and 500 bar, of 84 and 90%, respectively.

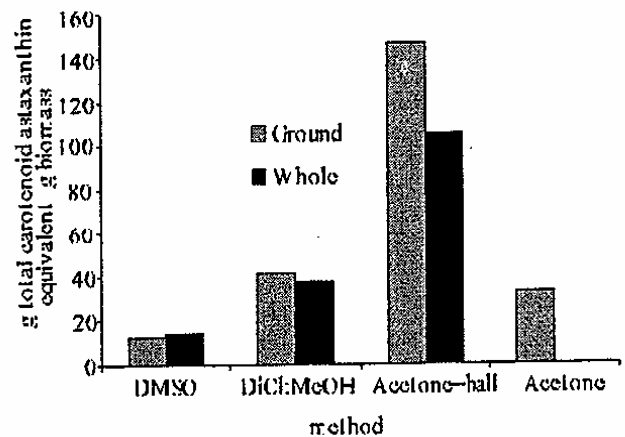


Fig. 4: Total carotenoids yield from the yeast *Phaffia rodozyma* (ground and whole biomass) by different solvent extractions methods

DMSO- Dimethylsulfoxide

DiCl:MeOH - dicloromethane:methanol (50:50 v:v)

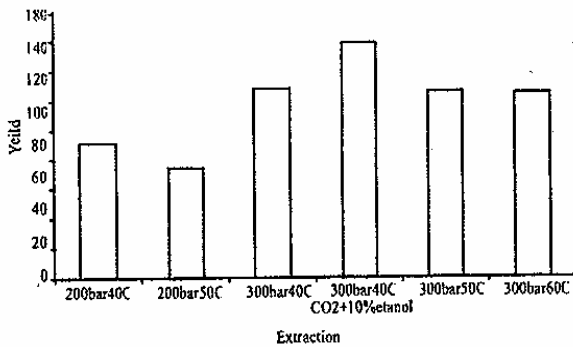


Fig. 5: Total carotenoids yield from the yeast *Phaffia rodozyma* by Supercritical CO₂ Extraction 2

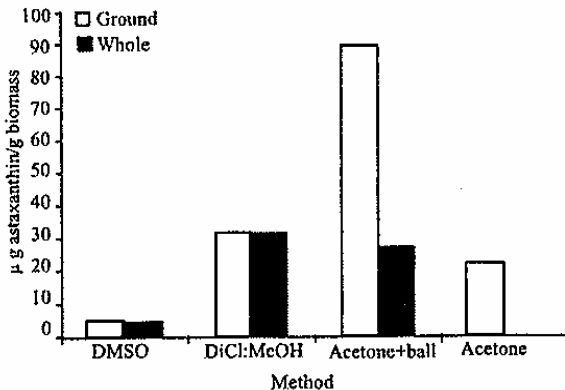


Fig. 6: Astaxanthin yield from the yeast *Phaffia rodozyma* (ground and whole biomass) by different solvent extraction methods.

DMSO- Dimethylsulfoxide

DiCl:MeOH - dicloromethane:methanol (50:50 v:v)

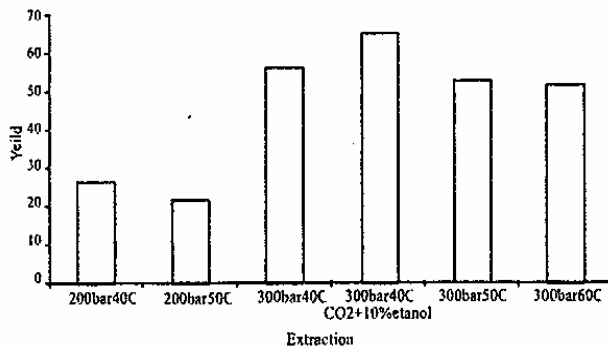


Fig. 7: Astaxanthin yield from the yeast *Phaffia rodozyma* by Supercritical CO₂ Extraction 2

However, these authors don't report the absolute yields (wt/wt), either of the organic solvent extraction or the supercritical one. On the other hand, the extraction with organic solvent was carried out only using acetone on the ground yeast.

CONCLUSIONS

Phaffia rodozyma is a producer of astaxanthin (90µg/g dry matter), which can be used in feed, food and/or health applications after the carotenoid extraction.

Several organic solvents, safe and unsafe, were tested to obtain the carotenoids from this yeast. The best extraction yield was obtained using acetone plus glass balls using well ground *Phaffia*. The highest recovery of carotenoids (about 100%) by supercritical fluid extraction was achieved at the pressure of 300 bar and the temperature of 40°C, using ethanol as co-solvent. The values obtained for astaxanthin were lower (about 75%).

Moreover, the extraction yield increased with the pressure at constant temperature and the increase of temperature, at constant pressure led to a decrease of the yield at 200 bar and to a slight decrease at 300 bar. Extraction yields decreased also with the flow rate.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Danilo Moriel for the yeast biomass production.

B. Nobre thanks FCT (Portugal) and R. Passos thanks CAPES (Brasil) for the research grants.

REFERENCES

1. Neuman, I., H. Nahum and A Ben-Amotz, 1999. Prevention of exercise-induced asthma by a natural isomer mixture of beta-carotene. Annual Allergy Asthma Immunology, 82: 549-553.
2. De Stefani, E., P. Boffetta, H. Deneo-Pellegrini, M. Mendilaharsu, J.C. Carzoglio, A. Ronco and L. Olivera, 1999. Dietary antioxidants and lung cancer risk: A case-control study in Uruguay. Nutrition Cancer, 34: 100-110.
3. Cooper, D.A., A.L. Eldridge and J.C. Peters, 1999. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: A review of recent research. Nutrition Review, 57: 201-214.
4. Gouveia, L., A. Raymundo, A.P Batista, I. Sousa and J. Empis, 2005. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as Colouring and Antioxidant in Food Emulsions. Eur Food Res. Technol, in press.
5. Yen, W.J. and B.H. Chen, 1995. Isolation of xanthophylls from Taiwanese orange peels and their effects on the oxidation stability of soybean oil. Food Chemistry, 53: 417-425.
6. Gouveia, L., V. Veloso, A. Reis, H.L. Fernandes, J. Empis and J.M. Novais, 1996. Evolution of the pigments in *Chlorella vulgaris* during carotenogenesis. Biores Technol, 57: 157-163.
7. Bar, E., M. Rise, S. Vishkautsan Arad, 1995. Colouring and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. J Plant Physiol, 146: 527-534.

8. Gouveia, L. and J. Empis, 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of Storage Conditions. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 4: 227-233.
9. Bon, J.A., T.D. Leathers and R.K. Jayaswall, 1997. Isolation of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol Lett*, 19: 109-112.
10. Yokoyama, A. And W. Miki, 1995. Composition and presumed bio-synthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiol Lett*, 128: 139-144.
11. Ambrogi, A., D.A. Cardarelli and R. Eggers, 2002. Fractional extraction of paprika using supercritical carbon dioxide and on-line determination of carotenoids. *J. Food Sci.*, 67 : 3236-3241.
12. Mendes, R.L., J. Coelho, H.L. Fernandes, IJ Marrucho, J.M.S. Cabral, J.M. Novais and A.F. Palavra, 1995a. Applications of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants. *J. Chem. Tech. Biotechno*, 62: 53-59.
13. Mendes, R.L., H.L. Fernandes, J. Coelho, E. Reis, J. Cabral, J Novais and A. Palavra, 1995b. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*, 53: 99-103.
14. Mendes, R., B.P. Nobre, M. Cardoso, A. Pereira and A. Palavra, 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorg Chimica Acta*, 356: 328-334.
15. Valderrama, J., M. Perrut and W. Wajewsky, 2003. Extraction of astaxanthine and phycocyanine from microalgae with supercritical carbon dioxide. *J. Chem Eng Data*, 48: 827-830.
16. Yamaguchi, K., M. Murakami, H. Nakano, S. Konosu, T. Kokura, H Yamamoto, M. Kosaka and K. Hata, 1988. Supercritical carbon-dioxide extraction of oils from antarctic krill. *J. Agric. Food. Chem.*, 34: 904-907.
17. López, M., L. Arce, J. Garrido, A. Ríos and M. Valcárcel, 2004. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by using supercritical fluid extraction. *Talanta*, 64: 726-731.
18. Lim, G.B., S. Lee, E. Lee, S. Haam and W. Kim, 2002. Separation of astaxanthin from the red yeast *Phaffia rodoyzma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Bioch. Eng. J.*, 11:181-187.
19. Moriel, D.G., I.M.P. Machado, J.D. Fontana and T.M.B. Bonfim, 2004. Optimization of biomass and astaxanthin production by the yeast *Phaffia rodoyzma*. *Braz J. Pharm Sc*, 40: 421-424.
20. Velu C.S., B. Czczuga and B. Munuswamy, 2003. Carotenoprotein complexes in entomostacan crustaceans (*Streptocephalus dichotomus* and *Moina micrura*). *Comparative Biochem Physiol Part B*, 135: 35-42.

FONTES NATURAIS DE CAROTENÓIDES DE INTERESSE PARA
AQUICULTURA: ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS
DE EXTRAÇÃO

FONTES NATURAIS DE CAROTENÓIDES DE INTERESSE PARA A AQUÍCULTURA: ANÁLISE COMPARATIVA DA EFICIÊNCIA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Renata PASSOS (renatapassos1978@yahoo.com.br)

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Danilo G. MORIEL (danimoriel@gmail.com)

Laboratório de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações, Universidade Federal do Paraná.

Francisco LAGREZE (flagreze@hotmail.com)

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Luisa GOUVEIA (luisa.gouveia@ineti.pt)

DER-Unidade de Biomassa, INETI, Lisboa, Portugal.

Marcelo MARASCHIN (m2@cca.ufsc.br); Luis H. BEIRÃO (beirao@cca.ufsc.br)

Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

Na Indústria Alimentar, em particular na Indústria Aquícola, a utilização de corantes tornou-se uma ferramenta indispensável na conquista de mercado, garantindo uma melhoria no aspecto e no aumento da aceitação e valor econômico de seus produtos. A associação dos corantes naturais às vantagens nutricionais e sua obtenção por processos de baixo custo têm reduzido a utilização de pigmentos de origem sintética na Indústria Alimentar em escala mundial. Desta forma, estudou-se a eficiência de três métodos de extração de pigmentos carotenóidicos totais e astaxantina das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* e da levedura *Phaffia rhodozyma*, potencialmente utilizadas no arraçoamento de peixes e crustáceos em cativeiro. Dentro das biomassas estudadas, a microalga *Haematococcus pluvialis* revelou o maior conteúdo de carotenóides totais (20,79 mg de carotenóides totais/g célula seca), enquanto a levedura *Phaffia rhodozyma*, apesar de um menor conteúdo de pigmentos totais (0,22 mg/g célula seca), apresentou a maior relação entre a concentração de astaxantina livre e o conteúdo de carotenóides totais (cerca de 87,5% dos carotenóides presentes como astaxantina livre), quando comparada aos outros microorganismos (*Chlorella vulgaris*, 13,4%; *Haematococcus pluvialis*, 4,7%). A utilização de dimetilsulfóxido DMSO como solvente revelou ser a melhor estratégia para a extração dos carotenóides dentro dos métodos estudados.

PALAVRAS-CHAVE: aquíicultura, carotenóides, astaxantina.

ABSTRACT

NATURAL SOURCES OF CAROTENOIDS OF INTEREST FOR AQUACULTURE:
COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFICIENCY OF EXTRACTION METHODS

In Food Industry, particularly Aquaculture Industry, the utilization of pigments has been an indispensable tool to market achievement, assuring an improvement on visual aspects, increase on acceptability and economic value of its products. The association of natural pigments to nutritional advantages and its acquisition by low cost processes have decreased the utilization of synthetic pigments in Food Industry, followed by a worldwide tendency for the reduction in the utilization of synthetic products on foods. Thus the pigmentation activity and pigment extraction efficiency of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* and the yeast *Phaffia rhodozyma*, potentially used on fish farming, were studied. The microalga *Haematococcus pluvialis* showed the highest total pigment content (20.79 mg of total carotenoids per gram of dried cells) while the yeast *Phaffia rhodozyma*, although showing the lowest total pigment content (0.22 mg/g dried yeast), showed the highest free astaxanthin content (87.5%) when compared to the other microorganisms studied (*Chlorella vulgaris*, 13.4%; *Haematococcus pluvialis*, 4.7%). The utilization of DMSO as solvent showed the highest efficiency on carotenoid extraction.

KEYWORDS: aquaculture, carotenoids, astaxanthin.

INTRODUÇÃO

A aqüicultura é uma atividade em crescente expansão devido ao aumento da população mundial e ao declínio de fontes pesqueiras naturais, associado ao consumo crescente de pescados em uma dieta equilibrada e saudável.

Astaxantina é o principal pigmento utilizado na aqüicultura, especialmente na criação de salmões, trutas e crustáceos. Estes organismos não são capazes de sintetizar carotenóides e, desta forma, estes pigmentos devem ser adicionados à sua alimentação para viabilizar sua incorporação e deposição na carne, conferindo a coloração característica da espécie e aumentando sua aceitação e valor de mercado.

A deposição de astaxantina em trutas e salmões é muito mais eficiente, comparativamente a outros carotenóides, sendo que a maioria dos criadores utiliza astaxantina sintética. Contudo, o custo deste insumo é elevado, aliado ao fato de que suas formulações podem conter configurações indesejadas de astaxantina e seus derivados, diminuindo sua eficiência na pigmentação (LATSCHA, 1990 e TORRISEN, 1995). Adicionalmente, observa-se uma tendência mundial à utilização de fontes naturais de nutrientes e à exclusão de componentes sintéticos da cadeia alimentar. Tais fatores têm aumentado o interesse em fontes naturais de astaxantina, sendo que diversas empresas têm investindo

na obtenção deste pigmento, a partir de fontes naturais (MCCOY, 1999). Atualmente, as fontes naturais mais promissoras de astaxantina são a microalga *Haematococcus pluvialis* (GOUVEIA et al., 1996) e a levedura *Phaffia rhodozyma* (MORIEL, 2005).

Neste contexto, a necessidade de obtenção de astaxantina a partir de fontes naturais com elevada produtividade, sustentabilidade e baixo custo, aliado ao uso de processos eficientes de extração e quantificação daquele carotenóide, vem direcionando pesquisas nesta área, buscando incrementos de qualidade e redução do custo do pescado produzido em cativeiro. Este trabalho avaliou a eficiência de três métodos de extração de carotenóides totais e astaxantina, a partir de fontes naturais, a saber, as microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* e a levedura *Phaffia rhodozyma*.

MATERIAL E MÉTODOS

MICROORGANISMOS

Amostras de biomassas das microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* foram gentilmente cedidas pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI – Portugal). Para o cultivo dos microrganismos e produção das biomassas de interesse, utilizou-se o protocolo e as condições experimentais descritas por Gouveia et al. (2006).

A levedura *Phaffia rhodozyma* (cepa ATCC 24202) utilizada nesse estudo foi cultivada conforme descrito por (BONFIM, 1999) e cedida pela Universidade Federal do Paraná.

Com o intuito de romper a parede celular e otimizar a extração dos pigmentos de interesse, amostras (10g – peso seco) das biomassas em estudo foram trituradas em moinho de bolas (NV-TEMA, Labor-Scheibenschwingmuhle, T100), por 60 segundos. Alíquotas de 100 mg de amostra triturada de cada microorganismo foram utilizadas, em três experimentos independentes, segundo o protocolo de extração dos pigmentos carotenóidicos.

EXTRAÇÃO

Três diferentes métodos de extração foram testados:

Método A: a extração e a determinação do conteúdo de carotenóides totais nas amostras em estudo foi realizada conforme método descrito por Lim et al. (2002), utilizando-se acetona (Merck, p.a.) como solvente. Sucintamente, a 100 mg de cada amostra foram adicionados 5 mL de acetona. A suspensão foi homogeneizada em agitador vortex e levada à centrifugação (10 krpm/5min). Os sobrenadantes foram coletados, seguido da repetição do procedimento descrito até a exaustão da extração dos pigmentos carotenóidicos, condição esta confirmada através da espectrofotometria de varredura UV-

Vis ($\lambda = 474 \text{ nm}$) dos sobrenadantes retirados. Ao final do processo de extração, os sobrenadantes coletados foram reunidos para efeitos de dosagem do teor de carotenóides totais.

Método AB: A cada 100 mg de amostra, adicionou-se concomitantemente 6 mL de acetona (Merck, p.a.) e 2 mL de bolas de vidro (Sigma, 425-600 microns), conforme descrito previamente por Goveia et al. (1996), seguido de agitação (Vortex) por 1 min, com intervalos de repouso em banhos de gelo por 20 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, repetindo-se o procedimento de forma a extrair exaustivamente os pigmentos das biomassas. A confirmação da ausência destes compostos nas amostras foi realizada através de espectrofotometria de varredura UV-Vis ($\lambda = 474 \text{ nm}$), considerando-se finalizado o procedimento quando valores de absorvância inferiores a 0.05 foram obtidos.

Método DMSO: A cada amostra (100mg) foram adicionados 2ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, p.a.), incubando-se o material em condição de repouso por 30 minutos, a temperatura ambiente, sob atmosfera de N_2 , na ausência de luz. Subsequentemente, o material foi centrifugado (3,5 krpm/5 min), recuperando-se o sobrenadante e repetindo-se o processo de extração com o material precipitado. Aos sobrenadantes coletados foram adicionados 10 ml de solução de NaCl 20% e éter de petróleo (1:1). A fase etérea foi coletada e, sob a fase aquosa, 5 mL de éter de petróleo foram adicionados por mais duas vezes. A fase etérea foi filtrada em suporte contendo Na_2SO_4 anidro e completada ao volume final de 25ml (adaptado segundo Moriel, 2005). Todas as extrações foram repetidas até que cor da biomassa se esgotasse nos solventes extratores, conforme descrito acima (*Método AB* – extração exaustiva). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

Para a quantificação dos carotenóides totais, os valores de absorvância a 477 nm (*métodos A e AB*) e 474 nm (*método DMSO*) foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu LC10. Para efeito de cálculo da concentração de carotenóides totais, utilizou-se a lei de Lambert-Beer para os métodos de extração *A* e *AB*, onde o valor da absorvância aplicado para a acetona foi de 219,8 L/g.cm, sendo o valor de carotenóides totais expresso em equivalentes de astaxantina. Para o método *DMSO*, calculou-se a concentração de astaxantina a partir de dados da literatura (ANDREWES e STARR, 1976, LIM et al., 2002), utilizando-se a absorvância específica para as xantofilas a 474 nm, i.e., $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 1.600$.

Para a identificação dos pigmentos, os extratos foram filtrados (0.22 μm) e injetados (10 μL) em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência HP-1100, equipado com coluna C_{18} de fase reversa (Vydac 201TP54, 250mm, 4,6 mm \varnothing), e detector UV-VIS (477 nm). Metanol:acetonitrila (90:10 v:v) foi utilizado como fase móvel, em fluxo de 1ml/min. A identidade de astaxantina livre no perfil

cromatográfico foi confirmada através do tempo de retenção (min) de padrão cromatográfico (1 mg/ml, SIGMA, St. Louis – USA, 98% de pureza) e para efeitos de cálculo da concentração daquele pigmento, utilizou-se uma curva-padrão externa ($r^2 = 0,99$), construída a partir da área do pico de interesse (R_t 4,59min), nas condições experimentais acima descritas.

Os dados obtidos foram sumarizados e analisados através do teste *t*-student ($p < 0,05$), com o auxílio do programa Statistica (v. 5.0). Tendo em vista o uso mais freqüente de *Haematococcus pluvialis* como suplemento carotenóidico da dieta de peixes e crustáceos cultivados em cativeiro, aquela microalga foi considerada como testemunha relativa, para efeito de análise estatística referente às biomassas fontes de carotenóides, enquanto o método *A* foi utilizado como referência comparativa para os tratamentos de extração em estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras das microalgas *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* apresentaram valores de conteúdos de carotenóides totais superiores, comparativamente ao observado para a levedura *Phaffia rhodozyma*, independente do protocolo de extração utilizado. Teores de carotenóides totais superiores em 16 e 82 ordens de magnitude foram detectados nas amostras de *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis*, em relação à amostra de *P. rhodozyma*, para os métodos de extração *A* e *AB* (Figura 1), respectivamente. Tal fato é de interesse, porque indica que o uso de bolas de vidro (*Método AB*) e a incubação das amostras em banho de gelo (20 min) não se mostraram vantajosos em relação à utilização do organosolvente isoladamente (*Método A*).

O método *DMSO*, por sua vez, revelou o efeito positivo do pré-tratamento das amostras com aquele solvente aprótico nas condições experimentais utilizadas. A interação do *DMSO* com os componentes de parede celular, corroborando para um relaxamento das estruturas macromoleculares associadas, é um fator que, em alguma extensão, parece favorecer a extração dos pigmentos carotenóidicos por organosolventes, i.e., éter de petróleo, conforme observado. De fato, o método *DMSO* mostrou-se como o de maior eficiência, independente da espécie fonte de carotenóides. Adicionalmente, ressalta-se que a associação de *DMSO* e éter de petróleo: NaCl (1:1) revelou a existência de concentrações de carotenóides totais altamente significativas ($p < 0,01$) em *H. pluvialis* (28785ug carotenóides totais/g biomassa seca), comparativamente à *C. vulgaris* (4413ug carotenóides totais/g biomassa seca) e *P. rhodozyma* (254ug carotenóides totais/g biomassa seca). Estes resultados dão suporte à preferência de uso de *H. pluvialis* como fonte de compostos carotenóidicos em sistemas intensivos de cultivos de peixes e crustáceos, por exemplo.

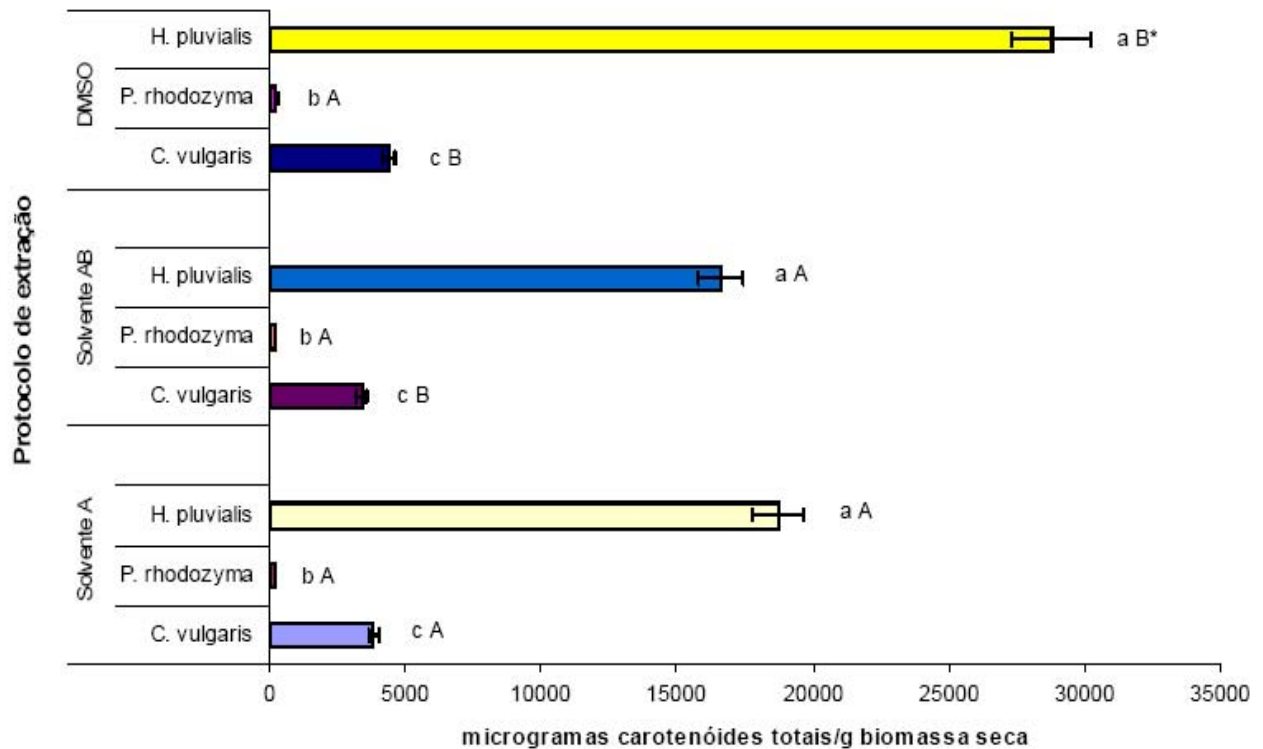


Figura 1 - Conteúdo de carotenóides totais (equivalentes de astaxantina) das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* e da levedura *Phaffia rhodozyma*, segundo o método de extração utilizado (A, AB e DMSO). Valores médios de três experimentos independentes (*t-student, $p < 0,05$), segundo a espécie fonte de carotenóides em estudo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ($p < 0,05$), segundo a fonte de carotenóides. Valores médios não diferem entre si ($p < 0,05$) para os métodos de extração, quando acompanhados pela mesma letra maiúscula.

A Figura 2 ilustra as distintas colorações das biomassas em estudo, previamente à extração dos pigmentos carotenóidicos.



Figura 2 - Amostras de biomassas liofilizadas dos microorganismos em estudo (a) *Chlorella vulgaris*, (b) *Phaffia rhodozyma* e (c) *Haematococcus pluvialis*, previamente à extração dos pigmentos carotenóidicos.

As análises por cromatografia líquida revelaram a eficiência na extração de astaxantina livre ($R_t = 4.59\text{min}$) em relação aos outros carotenóides, nomeadamente sobre o β -caroteno, equinenona. As amostras de *Haematococcus pluvialis* apresentaram concentrações de astaxantina livre de 2,6%, 1,7% e 4,7%, em relação ao conteúdo de carotenóides totais, com a utilização dos métodos *A*, *AB* e *DMSO*, respectivamente. De forma similar ao observado para a extração de carotenóides totais, o método *DMSO* evidenciou um rendimento superior ($p < 0,05$) à obtenção de astaxantina livre em relação aos demais tratamentos em estudo.

Para a microalga *Chlorella vulgaris*, valores de concentração de astaxantina livre de 13,1% (método *A*), 13,16% (método *AB*) e 13,4% (método *DMSO*) foram observados em relação ao conteúdo de carotenóides totais, indicando que os três métodos apresentaram a mesma eficiência na extração daquele carotenóide em sua forma livre. No entanto, conteúdos de astaxantina livre de 87,5%, 52,7% e 16,2% foram observados para os solventes *A*, *AB* e *DMSO*, respectivamente, para *Phaffia rhodozyma*. Este resultado é de interesse, uma vez que revela claramente a necessidade da escolha correta do(s) solvente(s) na definição de métodos extratores de alta eficiência. Dadas as características estruturais da parede celular de *Phaffia rhodozyma* (BONFIM, 1999), é instigante especular que o efeito da acetona foi mais efetivo em relação aos demais agentes extratores utilizados, no que concerne a uma maior permeabilização daquele componente celular, viabilizando um maior rendimento de extração de astaxantina livre, portanto.

Em resumo, os resultados demonstraram que para *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella vulgaris* o método *DMSO* foi o mais eficiente à extração de astaxantina livre ($p < 0,05$). De forma contrária, para as amostras da levedura *Phaffia rhodozyma*, o método *A* mostrou-se mais seletivo à extração de astaxantina livre. Em função disto, recomenda-se a determinação prévia da eficiência de sistemas extratores, quando se objetiva alcançar altos rendimentos e seletividade na obtenção dos pigmentos de interesse, haja vista a aparente especificidade de ação destes, segundo a fonte de carotenóides em estudo. Tal abordagem é de interesse tecnológico dado ao alto valor agregado dos pigmentos carotenóides à atividade aquícola e à saúde humana, bem como em processos de identificação e avaliação do potencial de novas fontes daqueles metabólitos secundários.

As microalgas em estudo apresentaram conteúdos altamente significativos ($p < 0,01$) de astaxantina livre em relação à levedura *Phaffia rhodozyma*, independentemente do solvente extrator utilizado (Figura 3). De forma interessante, destaca-se a similaridade de valores de conteúdo daquele pigmento nas amostras de microalgas observada para o método de extração *AB*, indicando claramente o efeito do sistema extrator sobre os resultados de rendimento do pigmento de interesse, a despeito das diferenças genéticas e bioquímicas (i.e., potencial produtivo intrínseco de cada genótipo) e de

tecnologia de produção das biomassas (i.e., sistemas de cultivo e manejo) entre aquelas amostras. Este resultado reforça a necessidade de definição de sistemas extratores adequados, de baixo custo e de alto rendimento, em processos produtivos de compostos de alto valor agregado e de reconhecida importância tecnológica nas áreas da aquicultura e da nutrição e saúde humana.

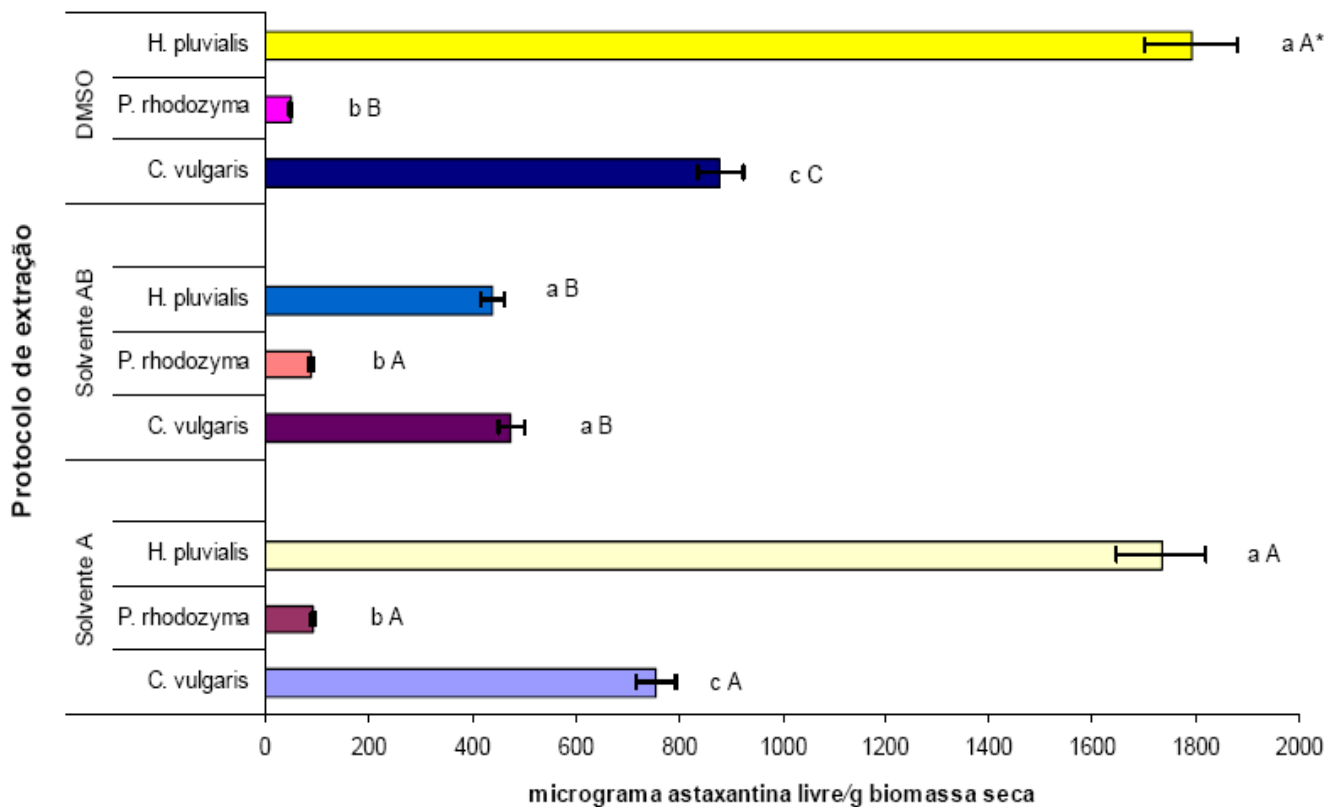


Figura 3 - Conteúdo de astaxantina livre de amostras de biomassas de microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* e de levedura *Phaffia rhodozyma*, segundo o método de extração DMSO, AB e A. Valores médios de três experimentos independentes (**t*-student, $p < 0,05$), segundo a espécie fonte de carotenóides em estudo. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si ($p < 0,05$), segundo a fonte de carotenóides. Valores médios não diferem entre si ($p < 0,05$) para os métodos de extração, quando acompanhados pela mesma letra maiúscula.

Na análise dos resultados obtidos, é de interesse considerar que as discrepâncias observadas nos valores de concentração dos pigmentos carotenóides para os tratamentos em estudo podem estar relacionadas, em alguma extensão, à ligação destes compostos a macromoléculas tais como proteínas protoplasmáticas e polissacarídeos (CREMADES et al., 2003; VELU, 2003) nas amostras, dificultando sua extração. Além disto, a degradação enzimática dos compostos carotenóides pode ser observada

no decorrer da etapa de moagem das amostras, ainda que o efeito deste processo possa ser inibido com a utilização de agentes antioxidantes e/ou inibidores enzimáticos.

O protocolo que considera o pré-tratamento das amostras via adição de DMSO mostrou-se o mais eficiente para as amostras de microalgas, explicado pelo fato de que aquele solvente aprótico promove o inchamento das células dos microorganismos em estudo, favorecendo a extração dos carotenóides com solventes orgânicos subseqüentemente (ANDREWES; STARR, 1976) (Figura 1). No que concerne aos resultados obtidos para *Phaffia rhodozyma*, entretanto, tal fato não foi observado, ressaltando-se que esta levedura apresenta uma parede celular de espessura bastante proeminente, o que dificulta sobremaneira a extração dos pigmentos em análise (BONFIM, 1999).

Outros métodos de extração vêm sendo estudados com o intuito de maximizar a extração dos carotenóides para posterior emprego alimentos, como é o caso do uso extração supercrítica associada ou não ao óleo de soja usado para a extração de carotenóides das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* (GOUVEIA et al., 2007; NOBRE et al., 2006)

Em estudo recente Nobre, et al., (2006), verificou que a extração de carotenóides de *Haematococcus pluvialis* com o uso do método *AB* mostrou resultados similares ao observado no presente trabalho para o conteúdo de carotenóides totais. No entanto, o método *DMSO* realizado neste estudo proporcionou ainda maiores percentagens de extração, cerca de 59,2% de carotenóides totais extraídos da microalga *Haematococcus pluvialis*.

Em outro estudo, Gouveia et al. (2006) apresenta concentrações na ordem de 4mg/g de carotenóides totais na microalga *Chlorella vulgaris*, um valor bastante próximo aos resultados encontrados dentro dos três métodos estudados: 4,4mg/g para o método *DMSO*, 3,4 mg/g para o método *AB*, e 3,8mg/g para o método *A*.

PASSOS et al. (2006) recentemente publicaram um estudo onde se verificou a extração de astaxantina por extração supercrítica e organosolventes na levedura *Phaffia rhodozyma*. Os autores concluíram que a biomassa moída em moinhos de bola e extraída com acetona apresentava o maior rendimento dentro das técnicas estudadas.

Adicionalmente, a extração supercrítica mostrou ter um rendimento em torno de 75% comparada com a extração com acetona. A extração supercrítica mostra-se ser uma alternativa eficaz, e de alta qualidade, uma vez que esta proporciona seus extratos de forma limpa, sem resíduos de solventes orgânicos.

CONCLUSÕES

Independentemente do método de extração escolhido, a microalga *Haematococcus pluvialis* parece ser a biomassa de escolha no que concerne à quantidade de carotenóides totais, assim como de astaxantina livre.

Entre os métodos de extração estudados, o método *DMSO* mostra ser de maior eficiência para a obtenção de carotenóides totais e astaxantina livre. Contudo, devido à alta toxicidade inerente aquele composto, este método deve ser reservado apenas para a quantificação em laboratório.

Sugere-se para estudos futuros uma análise detalhada sobre a facilidade em obtenção das três biomassas em análise e a sua produção de carotenóides em larga escala, com a finalidade de se obter a melhor relação custo-benefício entre os métodos e fontes de carotenóides estudadas.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Tânia Bonfim por ter cedido a levedura *Phaffia rhodozyma* para este estudo. A CAPES pela Bolsa de Estudos de Renata dos Passos e de Danilo G. Moriel

REFERÊNCIAS

- ANDREWES, A. G.; STARR, M. P. (3R, 3'R)-astaxanthin from yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry*, v. 15, p. 1009-1011, 1976.
- BONFIM, T. M. B. Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* (*Phaffia rhodozyma*) a partir de meios de cultura de baixo custo. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba, 1999. 159p.
- CREMADES, O. et al. Isolation and characterization of carotenoproteins from craysh (*Procambarus clarkii*). *Food Chemistry*, v. 82, p. 559–566, 2003.
- GOUVEIA, L.; GOMES, E.; EMPIS, J. Potential use of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, v. 202, p. 75-79, 1996.
- GOUVEIA, L. et al. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *European Food Research Technology*, v. 222, p. 362–367, 2006.
- GOUVEIA, L. et al. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry*, v. 101, p 717-723, 2007.
- LATSCHA, T. *Carotenoids - their nature and significance in animal feeds*. Basel: Hoffman-La Roche Ltd, 110p. 1990.

- LIM, G-B. et al. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemical Engineering Journal*, n. 11, p. 181-187, 2002.
- MCCOY, M. Astaxanthin market a hard one to crack. *Chemical and Engineering News*, v. 77, n. 14, p. 15-17, 1999.
- MORIEL, D. G. et al. Effect of Feeding Methods on the Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Fed-Batch Process. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, v. 48, n. 3, pp. 397-401, 2005.
- NOBRE, N. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research Technology* v. 223, p. 787-790, 2006.
- PASSOS, R. et al. Astaxanthin from the yeast *Phaffia rodoyzma*. Supercritical carbon dioxide and organic solvents extraction. *Journal of Food technology*, v. 4, n. 1, p. 59-63, 2006.
- TORRISEN, O. J. Strategies for Salmonid pigmentation. *J. Appl. Technol.*, n. 11, p. 276-278, 2005.
- VELU, C. S., CZECZUGA, B., NUNUSWAMY, N. Carotenoprotein complexes in entomostracan crustaceans (*Streptocephalus dichotomus* and *Moina micrura*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B. v. 135, p. 35-42, 2003. ❀

PIGMENTATION OF PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*,
BOONE, 1931) WITH CAROTENOIDS FROM NATURAL SOURCES.

PIGMENTATION OF PACIFIC WHITE SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*, BOONE, 1931) WITH CAROTENOIDS FROM NATURAL SOURCES.

R. Passos^{1*}, F. J. Lagreze¹, D. G. Moriel², T.M.B. Bonfim², L. Gouveia³, M. Maraschin⁴, L. Beirão¹.

^{1*}Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CCA, UFSC, Brasil. Avenida Ademar Gonzaga, 88034-010, SC, Brasil. renatapassos1978@yahoo.com.br

²Laboratório de Enzimologia, UFPR, Brasil.

³Departamento de Biomassa, DER, INETI, Portugal.

⁴ Plant Morphogenesis and Biochemistry Laboratory, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis-SC, Brasil.

ABSTRACT

The market value of shrimp is predominantly based on the visual appeal of their body colour. The main pigment found in shrimp's body is astaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β,β -carotene-4, 4'-dione), in the free or esterified form, being one of the main carotenoid pigment found in several species of crustaceans. We report the results of controlled feeding trials on the pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, obtained by feeding a diet supplemented with natural carotenoids from *Phaffia rhodozyma*, *Chlorella vulgaris* and NatuRose[®] for 28 days. In all cases in study, reversed-phase liquid chromatography revealed that astaxanthin was the predominant carotenoid detected in shrimps fed NR diet (14.5 ± 3.58 mg/kg dry weight) and PH diet (11.82 ± 0.92 mg/kg dry weight). These findings are in agreement with data from the visual observation of the aspect and colour of the shrimps. The expected coloration and astaxanthin content were obtained not only by feeding shrimps by using NatuRose[®], but also with *in natura* biomass of *Phaffia rhodozyma* and *Chlorella vulgaris*. Regardless of the carotenoid source, the main carotenoid accumulated was astaxanthin in free and esterified forms, showing that *Litopenaeus vannamei* has the metabolic ability to convert others carotenoids into astaxanthin. Additionally, the feeding with the sources utilized in this study had no significant effect on growth, final body weight, survival rate, and feed conversion ratio of the shrimps (data not shown). Taking together, these findings seems to be highly significant for the commercial aquaculture, because its shows that a

similar results can be achieved by supplementing diets with others natural alternative sources.

KEYWORDS: Carotenoids, astaxanthin, *Penaeus vannamei*.

INTRODUCTION

The market value of shrimp is predominantly based on the visual appeal of their body colour. Product appearance and resulting quality implications play a significant role in maintaining the highest consumer acceptance. The main pigment found in shrimp's body is astaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β,β -carotene-4, 4'-dione), in the free or esterified form, being one of the main carotenoid pigment found in several species of crustaceans (Yanar et al., 2004).

Astaxanthin is a strong coloring agent and has many functions in animals such as growth, vision, reproduction, immune function, and regeneration (Blomhoff et al. 1992; Tsuchiya et al. 1992; Beckett & Petrovich, 1999). Some reports support the assumption that daily ingestion of astaxanthin may protect body tissues from oxidative damage as this might be a practical and beneficial strategy in health management.

The carotenoid contents of shrimps vary depending on their native habitat, tissue sample, or manufactured diets, for instance, and a wide range of carotenoid content has been detected, i.e., 13.3 mg/kg to 72 mg/kg (Yanar et al., 2004; Gopakumar & Nair, 1975; Clarke, 1979).

Crustaceans and other animal are unable in producing astaxanthin, only plants and protists are capable of synthesizing carotenoids. Algae are the most important source of carotenoid pigments for the wild shrimp and as its reproduction and the production of carotenoid vary over the seasons, the content of carotenoid in wild shrimp tissues might be dependent on the season as well. Nevertheless, in commercial farms the color of shrimp tissues turns out from its feed.

Feed is a major expense in intensive aquaculture system and any reduction in the amounts of cost allocated to farm-raised shrimp could bring

important economic savings in commercial farms. Due to the increasing expenses in aquaculture, providing carotenoid pigments is of major concern, forcing farmers to utilize natural sources of such pigments. Thus, in the present study natural sources of carotenoids, i.e., yeast *Phaffia rhodozyma*, microalgae *Chlorella vulgaris*, and the commercial pigment NatuRose® were evaluated as supplements incorporated to the feed administered to Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultures. The feasibility of using those sources of carotenoids was determined by measuring the content of astaxanthin and total carotenoids in abdominal muscle and exoskeleton tissues samples, over a 28-day-long experimental period.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

Carotenoid standards were purchased from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) as well as HPLC grade solvents used for the extraction procedures and chromatographic analyses.

SOURCES OF CAROTENOIDS

Phaffia rhodozyma: Batch and fed-batch cultures were grown in a 21B Braun Biotech B bioreactor. The initial composition of the fermentation medium was sugarcane juice (20g total carbohydrate content/L) and urea (1g/L). The pH was set at $\text{pH } 6.0 \pm 0.2$ and controlled by the automatic addition of 1M NaOH and 1M H₂SO₄. The aeration was set at 1 vvm in order to maintain the dissolved oxygen concentration above 40%. The temperature was $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Moriel, 2005).

Chlorella vulgaris was cultured in an airlift bioreactor in appropriated medium (Vonshak, 1986), bubbling air, at 25°C, and luminosity intensity of $150\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Biomass recovery was carried out without flocculation by simply stopping agitation, concentrating by centrifugation and freeze-drying. Total pigment concentration was 0.4% (Gouveia *et al.*, 1996).

NatuRose: The commercial source of carotenoid pigments NatuRose® (Cyanotech, Hawaii-USA) contains 1.5% (w/v) astaxanthin extracted from *Haematococcus pluvialis* microalgae.

EXPERIMENTAL DIETS

Diets were formulated utilizing a commercial feed as base (Camaronina 35®, Purina, Brazil). With this basal diet, three other diets were formulated to contain 100ppm of total carotenoids (or astaxanthin) using the following biomass as source of carotenoids: yeast *Phaffia rhodozyma* (PH), microalgae *Chlorella vulgaris* (CHL), and the commercial pigment NatuRose® (NR - Cyanotech, Hawaii-USA).

The sources of carotenoids were added to as follows:

a) CD diet: Camaronina 35®, negative control diet, no added carotenoids;

b) PH diet: Basal diet plus yeast preparation containing 100ppm of astaxanthin;

c) CHL diet: Basal diet plus microalgae preparation containing 100ppm of astaxanthin;

d) NR diet: Basal diet plus NatuRose®, positive control diet containing 100ppm of astaxanthin.

The yeast preparation and microalgae preparation consisted of freeze-dried cells of *Phaffia rhodozyma* and *Chlorella vulgaris*, respectively.

All the ingredients were added to the basal diet as dried powder, mixed for 5 min, followed by the addition of gelatin (1,91g%), with an extra-mixing for more 5 min. The mixture was then extruded (1.5mm diameter) in a meat grinder in order to obtain pellets (0.5 – 1.0cm long) which were dried into an oven (40°C), for 8h. The dried feed pellets were separated and packed into plastic

bags and stored in the dark, at -18°C . The chemical composition of the formulated diets without add of pigments (Table 1) was further determined according to official methods (AOAC, 1995).

Table 1. Crude protein, carbohydrate, fiber, crude fat, and ash content (%) of the experimental diets formulated according to the source of carotenoids utilized (AOAC, 1995 - see analytical methods). CD: control diet, PH: *Phaffia rhodozyma* diet, CHL: *Chlorella vulgaris* diet, NR: Naturose diet.

Diet	Crude protein (%)	Carbohydrate (%)	Fiber (%)	Crude fat (%)	Ash (%)
CD diet	26.50	20.26	1.77	6.25	8.27
PH diet	25.00	19.79	4.36	11.36	7.46
CHL diet	27.12	19.00	2.75	6.85	9.08
NR diet	27.05	20.66	2.26	6.47	8.48

FEEDING TRIAL

The shrimp used in this assay, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), is commonly know as Pacific white shrimp. For its culture, three tanks were randomly assigned for each diet-treatment (triplicate) and no significant differences in shrimp length and weight were detected among replicates at the beginning of the experiment ($14 \pm 1\text{g}$, mean weight \pm standard deviation). Two hundred and forty shrimps were randomly allotted to 12 tanks (1m^3 , 20 shrimps. m^{-3}). Seawater was filtered through $5\mu\text{m}$ filter and the following conditions were maintained over a 28-day-long experimental period: salinity 25.14 ± 1.12 ppm, water temperature $27.3 \pm 1.8^{\circ}\text{C}$, pH 8.3 ± 0.25 and dissolved oxygen 6.44 ± 1.03 mg/L. Seawater was not changed to avoid contamination and ammonium nitrogen. Aeration was supplied 24h day^{-1} by bubbling air with aerator.

For the experiment, adult *L. vannamei* were fed with 2% of the body weight per day in feed, which was dispensed 3 times a day in equal proportion, at 08:00h, 16:00h and 24:00h, during 28 days. The relative weight increase (%) per shrimp was calculated by dividing the mean percent increase in weight by the number of shrimps per tank. The shrimp were weighed individually and the mortality rate was recorded daily. Experimental fed was performed in triplicate.

Two shrimps from each tank were randomly sampled at the beginning of the experiment (t_{zero}) and weekly, until day 28 for further analysis of the carotenoid content in their tissues.

ANALYTICAL METHODS

Chemical composition analysis of the diets was performed based on official methods (AOAC, 1995) as follows: a) dry matter after drying at 105°C, for 24h; b) ash by combustion at 550°C, for 12h; c) crude protein (Nx6.25) by Kjeldahl method after acid digestion, and d) crude fat after petroleum ether extraction in a Soxhlet apparatus (40-60°).

CAROTENOID ANALYSIS

The determination of pigmentation was carried out at the onset of the experiment by randomly selecting two organisms from each tank. Further, at days 7, 14, 21, and 28 three shrimps/tank were randomly sampled each time and sacrificed. Shrimp samples from each tank were pooled as one sample in order to allow the extraction of sufficient amount of pigment.

The shrimp exoskeleton and abdominal muscle were collected, washed through tap water flow, freeze-dried and grounded using a knife-mill for 1 min. Samples (1g/tissue) were extracted with acetone. Chromatographic analysis of the organosolvent extracts was performed on liquid chromatograph (Shimadzu LC-10) system provided with a reversed-phase column (Vydac 201TP54, 250mm/4.6mm - BioRad) and an UV/Vis detector (Shimadzu SP 10A, $\lambda = 477\text{nm}$), using acetonitrile:methanol (10:90, v/v), as eluent. The pigments were eluted over 20 min, at a flow rate of 1ml/min.

The identification of carotenoids was done by comparing the retention times with those of astaxanthin (Sigma, 98%). The carotenoids in the extracts were quantified in equivalents of astaxanthin by using an external standard-curve (1 $\mu\text{g/mL}$ to 5 $\mu\text{g/mL}$, $r^2 = 99.8$) taking into consideration the area of the peaks of interest.

STATISTICAL ANALYSIS

Treatment effects were identified by applying one-way analysis of variance (ANOVA – *Statistic* v. 6.0, USA) to the data, with the four diets as independent variables. Tukey test was performed to detect significant effects among the diets ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

GROWTH AND FEED CONVERSION RATION

Throughout the experimental period, shrimps showed a normal feeding behavior, despite the fact a slightly decrease in the body weight was detected in the first week for all the diets, excluding the basal one (CD - figure 1). This might be explained taking into account the need of an early adaptation of the shrimps to the new diets as well as to the occurrence of the exoskeleton-changing period (ecdise) in that time, a stressing condition therefore (Barbieri & Ostrensky, 2002). At final of the experiments there were no significant differences among the groups of shrimps fed experimental diets CD, PH, CHL, and NR, in terms of growth and feed conversion (2.27, 3.15, 2.18 and 1.31, respectively). The best result of growth and body weight increase was observed for the treatment with NR diet ($1.83 \pm 0.75\text{g}$) as the lowest increase was detected for PH diet ($0.76\text{g} \pm 0.50\text{g}$) as shown in figure 1. The survival mean index was 99.5% for all the treatments.

VISUAL ASPECT AND COLOUR

In exoskeleton of living crustaceans, the orange-red colour of the astaxanthin may be modified to brown, purple, green or blue through the formation of carotene-protein complexes; the red colour is revealed on cooking. The normal appearance of the animals in the wild is given by combination of carotene-protein complexes and free carotenoid.

Visual observation by nude eye of fresh shrimp sampled at day 28 indicated a significant difference of effect among the experimental diets. The color scores of the experimental shrimps are given in figure 2. The desired

colour was attained at day 28 in the group fed NR diet and PH diet. Before boiling for 3 minutes the shrimps, the colour turned dark brown for shrimp fed with NR and PH diets and medium brown for shrimp fed with CD and CHL diets.

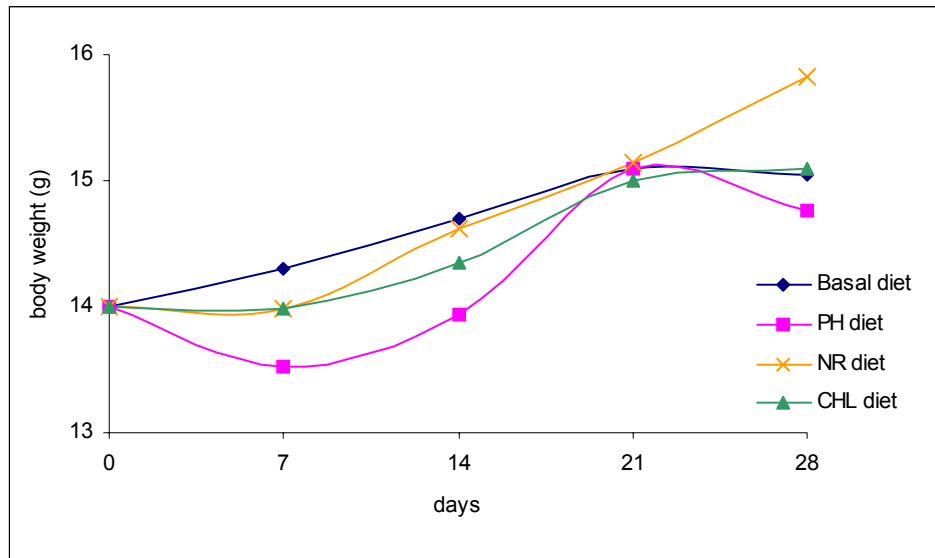


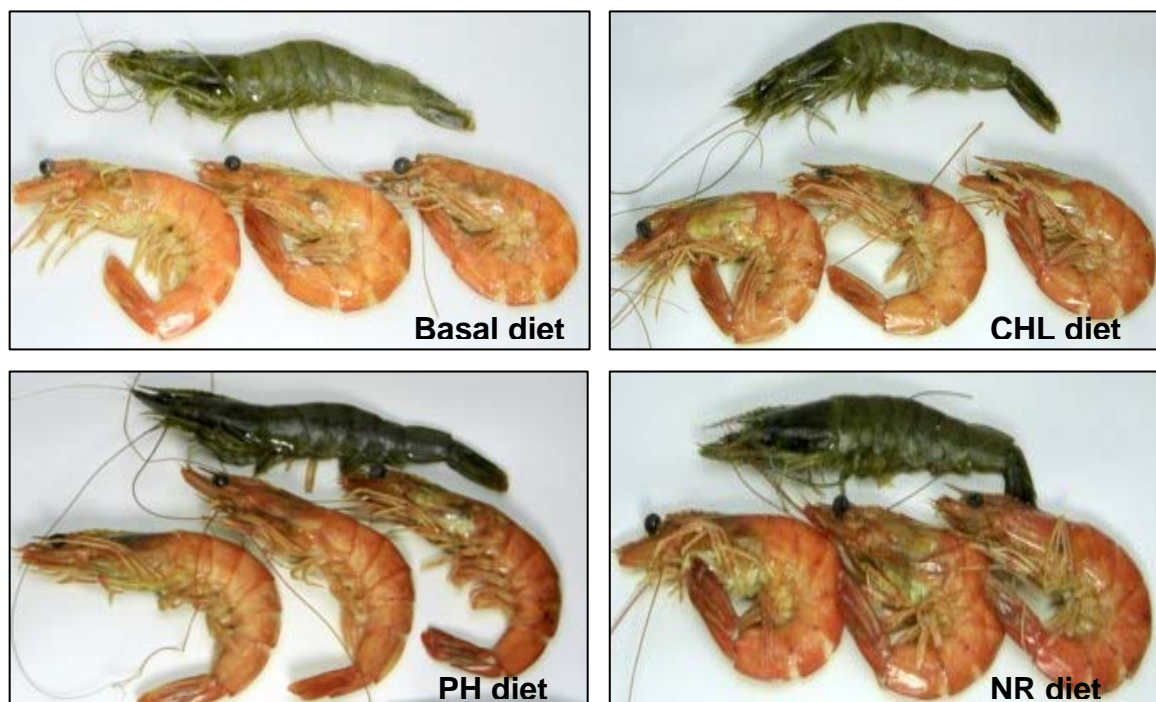
Figure 1. Body weight (g) increase of *Litopenaeus vannamei* cultures fed basal diet (CD), PH diet, NR diet, and CHL diet according to each sampling period. CD: control diet, PH: *Phaffia rhodozyma* diet, CHL: *Chlorella vulgaris* diet, NR: Naturose diet.

Interestingly, the most pigmented shrimps (PH diet) were not those showing the highest body weight increase (NR diet). These results might be due to the PH diet presents the highest fiber content (4.36%, Table 1), originated from the cell wall of *Phaffia rhodozyma*, a trait that corroborates to reduce the digestibility of that yeast biomass, but without a penalty for the assimilation of the pigments by *L. vannamei*. Furthermore, these findings might demonstrate in any extension that growth is not correlated to the development of body tissue pigmentation.

PIGMENTATION

The organosolvent extracts of the tissue samples in study presented similar HPLC profiles. Free astaxanthin was identified by its retention time, absorption spectrum and comparison with astaxanthin standard. Other carotenoids with absorption spectra identical to astaxanthin appeared in appendices characteristics of mixtures of astaxanthin monoesters and diesters.

Astaxanthin and its esters came up for around 90% of the total carotenoid in all the samples analyzed.



Experimental diet	Colour score
	Boiled shrimp (3 min)
Basal diet	20 – 25
CHL diet	22 – 27
PH diet	26 – 32
NR diet	29 - 34

¹*SalmoFan*TM was developed on the basis of the colour of fresh salmonid flesh pigmented with Carophyll[®] pink. Light conditions can influence visual colour perception.

Figure 2. The colour scores (*SalmoFan*TM)¹ for *Litopenaeus vannamei* fed different source of carotenoid and astaxanthin at 28° day. CD: control diet, PH: *Phaffia rhodozyma* diet, CHL: *Chlorella vulgaris* diet, NR: Naturose diet.

Exoskeleton pigmentation: Interestingly, with exception to CHL diet, all experimental diets showed an increase higher than two orders of magnitude in concentration of total astaxanthin during the first week, as for the second week a prominent result was found by using NR diet. Such a diet not allowed similar results in the third week, where the exoskeleton of shrimps fed PH diet and Basal diet showed higher concentration of astaxanthin. As the feeding trial continued to 28 days, diets showed non-significant ($p < 0.05$) differences in that time. Furthermore, with exception to CHL diet, all the other diets induced a very slight decrease in pigmentation (Fig. 3) at the end of the experiment.

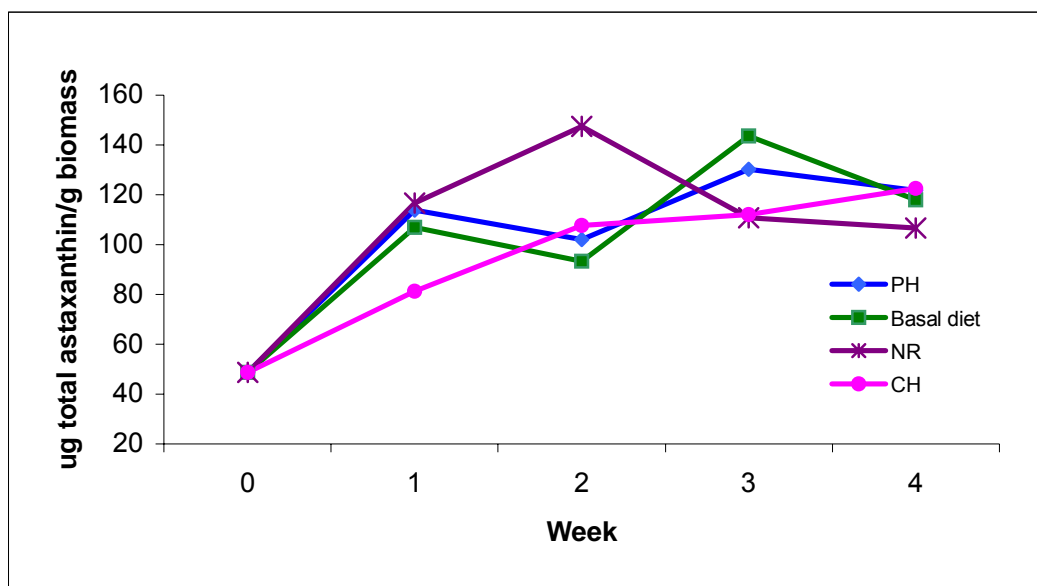


Figure 3. Total astaxanthin (ug/g dry weight) content of shrimp *Litopenaeus vannamei* cultures after feeding experimental diets PH, Control diet, NR, and CHL for 4 weeks. CD: control diet, PH: *Phaffia rhodozyma* diet, CHL: *Chlorella vulgaris* diet, NR: Naturose diet.

Abdomen pigmentation: HPLC analysis confirmed that for all the treatments astaxanthin and its esters forms were the predominant carotenoids found (Table 2). Table 3 shows the total carotenoid concentration for the shrimp's abdominal muscles samples according to the treatments at days 0, 7, 14, 21, and 28. At day 28, the data revealed that the diet NR led to higher pigment assimilation followed by PH, CD (negative control), and CHL diets,

respectively, despite no significant differences ($p < 0.05$) were found for the treatments in study.

Table 2. Total astaxanthin content (mg/kg body weight, mean \pm SEM) of abdominal muscle samples of *L. vannamei* fed with CD, CHL, PH, and NR diets, according to the sampling time. CD: control diet, PH: *Phaffia rhodozyma* diet, CHL: *Chlorella vulgaris* diet, NR: Naturose diet.

Diet	7 day	14 day	21 day	28 day
CD	8.11 \pm 0.68	16.52 \pm 5.59	8.81 \pm 1.79	11.08 \pm 1.12
CHL	8.2 \pm 1.21	10.99 \pm 1.66	11.25 \pm 2.89	10.20 \pm 0.91
PH	8.65 \pm 1.42	8.82 \pm 0.51	9.11 \pm 3.57	11.82 \pm 0.92
NR	8.16 \pm 1.69	9.97 \pm 1.66	13.73 \pm 0.52	14.5 \pm 3.58

Table 3. Total carotenoid concentration (mg/kg body weight, mean \pm SEM) of abdominal muscle samples of *L. vannamei* fed with CD, CHL, PH, and NR diets, according to the sampling time. CD: control diet, PH: *Phaffia rhodozyma* diet, CHL: *Chlorella vulgaris* diet, NR: Naturose diet.

Diet	7 day	14 day	21 day	28 day
CD	42.30 \pm 1.55	48.83 \pm 2.68	42.70 \pm 3.55	53.00 \pm 1.17
CHL	41.60 \pm 3.14	53.50 \pm 3.76	55.70 \pm 5.07	48.50 \pm 3.89
PH	43.50 \pm 3.55	43.10 \pm 0.98	40.90 \pm 10.60	60.90 \pm 1.13
NR	44.50 \pm 0.81	48.70 \pm 3.83	63.60 \pm 1.50	71.40 \pm 8.61

In the table 2 and 3, one can observe that in all diets, with exception of CHL diet, the accumulation of pigments in the sampled tissues ascended in the last week.

After 21 days, the total amount of carotenoids in the abdominal muscle dropped from values exhibited at day 14 for the CHL diet. These data might suggest that the depletion mechanism of carotenoids from CHL diet (*Chlorella vulgaris* diet) is much more pronounced than that of carotenoids from *Phaffia rhodozyma* and NatuRose sources. By day 28, the NR diet allowed the most efficient pigmentation of the abdominal muscle tissue (71.4 \pm 8.61mg/kg dry weight), indicating that the assimilation of carotenoids by the shrimps from that source (*Haematococcus pluvialis* crushed preparation) is more efficacious. Nevertheless, the concentration of carotenoids in shrimps fed *Phaffia rhodozyma in natura* should be taken into account, since prominent values of carotenoid contents were detected (60.9 \pm 1.13mg/kg dry weight), despite any

pre-treatment of that yeast biomass has been performed. This is of interest as one bears in mind the fact that *P. rhodozyma* usually presents a thick cell wall, making difficult the extraction of the pigments over the digestive tract of that crustaceous (Storebakken *et al*, 2004). Other factor worth mentioning is that the yeast *P. rhodozyma* presents in carotenoid content astaxanthin in its free form as the major compound, on the contrary as observed for the others sources in analysis where other carotenoids are also found, e.g. β -carotene and lutein. Yamada *et al.* (1990) reported that astaxanthin was more effective for pigmentation than β -carotene or canthaxanthin in shrimps *Penaeus monodon*. However, it has been demonstrated that feed containing algal preparation (*Dunaliella salina*) and β -carotene might be effective for *Penaeus monodon*'s tissue pigmentation (Boonyaratpalin *et al.*, 2001).

In all cases in study, reversed-phase liquid chromatography revealed that astaxanthin was the predominant carotenoid detected in shrimps fed NR diet ($14.5 \pm 3.58\text{mg/kg}$ dry weight) and PH diet ($11.82 \pm 0.92\text{mg/kg}$ dry weight). These findings are in agreement with data from the visual observation of the aspect and colour of the shrimps.

Boonyaratpalin *et al.* (2001) investigating the effect of diet composition on *Penaeus monodon* cultures demonstrated that the diet supplemented with β -carotene, astaxanthin, and algae preparation (*Dunaliella salina*) was more efficacious for tissue pigmentation of that species. In addition, the authors proved that high β -carotene sources might be interesting for the aquaculture farms. In fact, this issue has long been reviewed by Castillo, Negre-Sadargues and Lenel (1992) and by Goodwin (1992), showing the existence of alternative pathways or reaction sequences by means of canthaxanthin (β,β -carotene-4, 4'-dione), zeaxanthin (β,β -carotene-3, 3'-diol) and even β -carotene can undergo metabolic conversion to astaxanthin.

Lutein, tunaxanthin, astaxanthin diester, astaxanthin monoester and free astaxanthin (Negre-Sadargues *et al.* 1993) were found in shrimp carapace (Decapoda: Penaeidae): The main pigment that colors shrimp muscle is

astaxanthin, and when present in the diet it may be deposited directly in the tissue as an ester of astaxanthin (Yamada et al., 1990).

Alternative biosynthetic pathways of carotenoids have been proposed as reviewed by Castilho, Negre-Sardargues and Lenel (1982), and Goodwin (1992). There are many reports showing the capability of crustaceans to introduce structural modifications into carotenoids that they obtain from their diet, in particular by introducing hydroxyl groups at C(3) and C(3') and keto groups at C(4) and C(4'). Thus, canthaxanthin, zeaxanthin, and even β -carotene can undergo metabolic conversion into astaxanthin.

In several cases, where the main carotenoid is generally astaxanthin, some conversion of β -carotene into astaxanthin has been reported. This raises the possibility that if the conversion is efficient enough, feeding β -carotene or products rich in β -carotene could provide an alternative and a cheaper means of achieving the desired coloration in crustaceans (Liao *et al.* 1993).

The Pacific white shrimp muscle and exoskeleton can be suitable pigmented with carotenoids from many natural sources when the concentration and bioavailability of the main carotenoid is equivalent to that of astaxanthin. Feeding trial lengths should be carefully established, as a mechanism of pigment assimilation, saturation, and depletion seems to be involved. Depletion of water soluble carotenoids is much more pronounced than that of oil soluble carotenoids in abdominal muscle.

CONCLUSIONS

For the shrimps in extensive aquaculture systems, the normal colour desired by the consumer is achieved only by feeding a diet supplemented with carotenoid. The carotenoid content in shrimps fed diets containing no carotenoids supplemented was unexpectedly high, indicating that feed supplemented with vitamin A, as Camaronina 35®, is also of interest for the development of color of shrimp's tissue as herein shown. Further, it also allows speculating the possible bioconversion by shrimps of vitamin A in pigments of interest in aquaculture.

The expected coloration and astaxanthin content were obtained not only by feeding shrimps by using NatuRose[®], but also with *in natura* biomass of *Phaffia rhodozyma* and *Chlorella vulgaris*.

Regardless of the carotenoid source, the main carotenoid accumulated was astaxanthin in free and esterified forms, showing that *Litopenaeus vannamei* has the metabolic ability to convert others carotenoids into astaxanthin. Additionally, the feeding with the sources utilized in this study had no significant effect on growth, final body weight, survival rate, and feed conversion ratio of the shrimps (data not shown). Taking together, these findings seems to be highly significant for the commercial aquaculture, because its shows that a similar results can be achieved by supplementing diets with others natural alternative sources.

ACKNOWLEDGEMENTS

Passos, R. and Moriel, D. G. thanks CAPES (Brasil) for the research grants.

REFERENCES

Beckett, B.R. & Petkovich, M., 1999. Evolutionary conservation in retinoid signalling and metabolism. *Amer. Zool.*, 39, 783 –795.

Blomho, R., Green, M.H. & Norum, K.R., 1992. Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Annu. Rev. Nutr.*,12, 37 – 57.

Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G. & Schlipalius, L.E. 2001. Effects of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival, and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*. Vol.32 P 182.

Castillo R., NeÁgre-Sadargues G. & Lenel R., 1982. General survey of the carotenoids in Crustacea. In: Carotenoid Chemistry and Biochemistry (ed. by G. Britton & T.W. Goodwin), 211 -224. IUPAC-Pergamon, Oxford.

Goodwin, T. W., 1992. Distribution of Carotenoids. Methods in enzymology, California, v. 213, p. 167-172. Carotenoids, Part A: Chemistry, separation, quantitation, and antioxidation.

Gouveia, L. Gomes, E., Empis, J., 1996. Use of *Chorella vulgaris* in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), diets to enhance muscle pigmentation. Journal of Applied Aquaculture 7, 61-70.

Johnson, E.A., Villa, T.G., Lewis, M.J., 1980. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. Aquaculture 20, 123–134.

Liao W.L., Nur-E-Borhan S.A., Okada S., Matsui T. & Yamagushi K., 1993. Pigmentation of cultured black tiger prawn by feeding with Spirulina-supplemented diet. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 59, 165±169.

Moriel, D.G., Chociai, M., Machado, I.M.P., Fontana, J. D., Bonfim, T.M.B., 2005. Effect of feeding methods on the astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in fed-batch process. Braz. arch. biol. technol. vol.48 n.3. p. 397-401.

Negre-Sadargues G., R. Castillo, H. Petit, S. Sance, R.G. Martinez, J. Milicua, G. Choubert and J. Trilles., 1993. Utilization of synthetic carotenoids by the prawn *Penaeus japonicus* reared under laboratory conditions. Aquaculture 110:151-159.

Sanderson, G.W., Jolly, S.O., 1994. The value of *Phaffia* yeast as a feed ingredient for salmonid fish. Aquaculture 124: 193– 200.

Storebakken, T., No, H. K., 1992. Pigmentation of rainbow trout. Aquaculture 100: 209-229.

Tangeraas, A., Slinde, E., 1994. Coloring of salmonids in aquaculture: the yeast *Phaffia rhodozyma* as a source of astaxanthin. In: Martin, A.M. (Ed.), Fisheries Processing: Biotechnological Applications. Chapman & Hall, London, pp. 391– 431.

Tsuchiya, M., Scita, G., Freisleben, H.L., Kagan, V.E. & Packer, L., 1992. Antioxidant radical-scavenging activity of carotenoids and etinoids compared to b tocopherol. *Methods Enzymol.*, 213, 460 – 472.

Vonshak, A., 1986. In: Richmond A (ed) CRC handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Boca Raton, USA, pp 117–143.

Yamada S., Tanaka, Y., Sameshima, M. and Ito Y., 1990. Pigmentation of prawn (*Penaeus japonicus*) with carotenoids. I. Effect of dietary astaxanthin, beta-carotene and canthaxanthin on pigmentation. *Aquaculture* 87:323-330.

Yanar, Y., Celik, M., & Yanar, M., 2004. Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus* and *Metapenaeus monoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. *Food Chem.* 88: 267-269.

ANEXOS

Beatriz Nobre · Filipa Marcelo · Renata Passos ·
Luís Beirão · António Palavra · Luísa Gouveia ·
Rui Mendes

Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*

Received: 12 August 2005 / Revised: 10 January 2006 / Accepted: 19 January 2006 / Published online: 4 March 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from *Haematococcus pluvialis* was carried out, for several experimental conditions, using a semi-continuous apparatus. The microalga was previously freeze-dried and ground with a ball mill. The effects of pressure (200 and 300 bar), temperature (40 and 60 °C), degree of crushing, as well as the use of ethanol as a co-solvent (10%) on the extraction efficiency were assessed. Organic solvent extractions, using acetone, were also carried out in a vortex, on ground cells mixed with very small glass beads. Supercritical extraction from the completely crushed alga was compared with acetone and the highest recovery of carotenoids (92%) was obtained at the pressure of 300 bar and the temperature of 60 °C, using ethanol as a co-solvent.

The extraction recovery increased with the pressure at 60 °C. On the other hand, the increase in temperature, at 300 bar, led to a slight improvement. The main carotenoid of *Haematococcus pluvialis* is the esterified astaxanthin (about 75%). Other carotenoids present are lutein, astaxanthin (free), β -carotene and canthaxanthin. All of them were recovered through supercritical fluid extraction with values higher than 90%, with the exception of canthaxanthin (about 85%), at a pressure of 300 bar and a temperature of 60 °C.

Keywords Microalga · *Haematococcus pluvialis* · Carotenoids · Astaxanthin · Supercritical fluid extraction

Introduction

Among the ketocarotenoids found in natural sources, astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione) is one of the most important, either from a commercial or a biotechnological point of view. Besides the known applications as colour agent (in fresh and processed foods, for instance) [1] and in animal feeding (mainly aquaculture), the intake of astaxanthin can reduce the risk of cardiovascular diseases, as well as lung and breast cancers. A great number of other health applications has also been suggested or studied [2]. In spite of their potential use as an antioxidant and chemopreventive agent against carcinogens, the main application of astaxanthin is still in fish farming [2]. As the volume of salmon, shrimp and trout farming is increasing, the demand for carotenoid pigmentation will undoubtedly continue to grow. Synthetic astaxanthin, widely used as supplementation of feed, by fish farmers, may constitute 10–20% of the feed cost [3]. The high cost of synthetic pigments and trends to search for natural ones has led to the exploitation of micro-organisms as biotechnological producers.

Among carotenoid-producing organisms, *Haematococcus pluvialis* is the best one, accumulating astaxanthin in its aplanospore. It can be also used as a whole biomass for animal feed [4, 5] and food purposes [6] as a pigment source and as an antioxidant agent, but for some food and health applications astaxanthin should be extracted [7]. Because of the increase of legal restrictions to the use of toxic organic solvents, it is important to obtain the carotenoids/astaxanthin free of such solvents through supercritical carbon dioxide extraction (SFE) [8].

Valderrama et al. [9] submitted microalga *H. pluvialis* to SFE with CO₂ and CO₂ modified with ethanol, but only data concerning astaxanthin were reported and no mention was made to the astaxanthin esters and other carotenoids (lutein, canthaxanthin and β -carotene) present in the

B. Nobre · F. Marcelo · L. Gouveia (✉) · R. Mendes
Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial-
INETI-DER- Unidade Biomassa, Estrada do Paço do Lumiar,
1649-038 Lisbon, Portugal
e-mail: luisa.gouveia@ineti.pt
Tel.: +351-21-7127210
Fax: +351-21-7127195

R. Passos · L. Beirão
Departamento de Ciência dos Alimentos, UFSC,
Avenida Ademar Gonzaga, 88034 SC, Brazil

A. Palavra
Departamento de Engenharia Química, IST,
Avenida Rovisco Pais,
1096-001 Lisbon, Portugal

microalga. Because more than 90% of the astaxanthin in *H. pluvialis* is in the form of astaxanthin esters [10, 11], it is important to know the extracts composition in what concerns these compounds.

The main objective of this work is to study the extraction of astaxanthin, astaxanthin esters and other carotenoids from *H. pluvialis* using supercritical CO₂, in order to evaluate the best conditions of extraction.

Materials and methods

Microalga

The microalga *H. pluvialis* (INETI 33) was cultivated in an appropriate medium [12] and after growing in airlift bioreactors, at the temperature of 25 °C and at low light conditions (150 μE m⁻² s⁻¹). Carotenogenesis was performed by nitrogen starvation and NaCl addition (2%) [13], at high luminosity (1,000 μE m⁻² s⁻¹), which was favoured by culture dilution. Microalgal biomass harvesting was carried out without flocculation, stopping agitation, concentrating by centrifugation and freeze-drying. Total pigment content was 1.8% (w/w; dry basis), measured by the acetone extraction method [14].

Extractions

The microalga *H. pluvialis*, whole and ground freeze-dried, mixed with 500 μm glass beads (2 ml), was submitted to extraction by acetone, in a vortex, until there was total absence of colour in the biomass. On the other hand, SFE with CO₂ was carried out on the same microalga at different experimental conditions, in order to study the effect of pressure (200 and 300 bar), temperature (40 and 60 °C), degree of crushing, as well as the effect of co-solvent (ethanol 10%/CO₂ 90%, (v/v)) on the extraction yield.

Crushing of the cells was done with a disk vibratory mill NV-TEMA (Labor-Sheibenschwingmuehle, type T100, 0.75 kW, 1000 V min⁻¹). Cells crushed-degree 2, means the double time of crushing of crushed-degree 1 (5 g for 20 s).

The SFE measurements were carried out in a semi-continuous apparatus previously described in detail [15]. In this apparatus, a metering pump compresses the fluid to the desired pressure, which is controlled by a back-pressure regulator. In order to guarantee that the fluid reaches the extraction vessel (a 5-ml vessel filled with 2 g of microalga), at the desired conditions of temperature, the CO₂ passes through a coil immersed in a temperature-controlled water bath. After flowing through the alga bed, contained in the extraction vessel, the supercritical fluid was expanded to atmospheric pressure through a three-way valve, the extracts being collected in cooled glass U-tubes filled with glass wool. CO₂ flow rate was monitored with a rotameter and the total volume of gas was measured with a wet test meter.

At the end of each run, the extracted carotenoids were recovered by washing with acetone the glass wool, the inside of the three-way valve and the expansion tubing.

Total carotenoids quantification

To assess the amount of total carotenoids extracted, UV-Visible spectra (Hitachi U-2000) were run, between 380 and 700 nm, and the concentration of total carotenoids was determined (in equivalents of astaxanthin) using Eq. (1) [16] with the value of 2198 [17] for the specific optical extinction coefficient ($E_{1cm}^{1\%}$) at $\lambda = 477$ nm (wavelength of the maximum absorbance of astaxanthin in acetone)

$$x = \frac{Ay}{E_{1cm}^{1\%} \times 100} \quad (1)$$

where x is the amount of pigment (g), y is the amount of solvent (ml) and A is absorbance.

Carotenoids identification and quantification

All carotenoid extracts obtained by SFE were filtered and injected in HPLC (HP-1100) provided with a μ -Bondapack C18 (250/4.6 mm) column and a detector UV/VIS Waters 481 ($\lambda = 477$ nm), using methanol (with 0.2% water): acetonitrile (75:25) as eluent. The pigments were eluted for 20 min at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The identification of carotenoids was done comparing the retention times with those of astaxanthin (Sigma, 98%), canthaxanthin (Roche, 10%), lutein/zeaxanthin (FloraGLO, Kemin, 5%), echinenone (Roche, 98%) and *trans*- β -carotene (Sigma, 95%) standards.

The individual carotenoids in the extracts were quantified in equivalents of astaxanthin by using the percentage of HPLC area of the total carotenoids. These carotenoids were obtained by UV-VIS spectrophotometry.

Saponification

Extracts saponification was carried out in order to hydrolyse astaxanthin esters to free astaxanthin. The esters were dissolved in CH₂Cl₂ and 1% KOH in MeOH (1 ml) was added under nitrogen atmosphere. The solution was stirred at room temperature for 4 h, and afterwards at 5 °C during 12 h. After hydrolysis the solution was neutralized with 1% aq. NH₄Cl (3 × 5 ml) and astaxanthin extracted with diethyl ether (3 × 5 ml). Organic phase was filtered through a Na₂SO₄ bed (to remove the residual aqueous phase) and evaporated under N₂ atmosphere. The saponified extract was then dissolved in acetone containing 0.2 wt% BHT [18]. This solution was filtered and injected in the HPLC system.

Table 1 Yield and recovery of total carotenoids from *Haematococcus pluvialis* for all extractions

Extraction methods and solvents	Yield (g/100 g)	Recovery (%)
Acetone	1.8	100.0
SFE, CO ₂ , microalga crushed-degree 1	0.8	46.7
SFE, CO ₂ and ethanol, microalga crushed-degree 1	1.0	58.7
SFE, CO ₂ and ethanol, microalga crushed-degree 2	1.6	91.8

Results and discussion

Carotenoids recovery

Effect of crushing and addition of co-solvent

The recoveries of the carotenoids (mass of extracted compounds/mass of extracted compounds by acetone \times 100) and yields (mass of extracted compounds/mass of biomass) for some extractions are shown in Table 1.

The maximum recovery (100%) was considered as being the one obtained with acetone at room temperature. The presence of the co-solvent ethanol improves extraction recovery (about 25%) at the studied supercritical conditions.

The yield of SFE (CO₂ plus ethanol) is higher for the most crushed microalga (91.8% recovery against 58.7%, respectively). Figure 1 shows the effect of ethanol, as a co-solvent, in the recovery of total carotenoids. The improvement in the yield by the ethanol can be due to two effects: the increase of astaxanthin and other carotenoids solubility in supercritical CO₂ plus co-solvent, due to the polar character of the carotenoids, which makes easy the formation of hydrogen bonds with ethanol present in the CO₂ stream and the swelling of the biomass pores, which eases the release of the pigments [19].

On the other hand, Fig. 2 presents the total carotenoid recovery as a function of the CO₂ amount for two microalga crushing degrees. There is a significant increase of recovery for the most crushed microalga. The recovery improvement may be due to the increase of the number of disrupted cells and so a higher amount of available carotenoids to extraction.

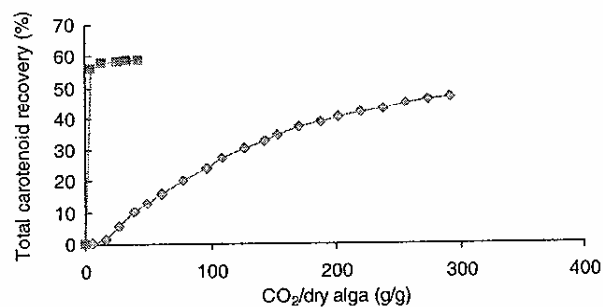


Fig. 1 Recovery of total carotenoids as a function of CO₂ amount at 60 °C and 300 bar, with (■) and without (◆) ethanol as a co-solvent

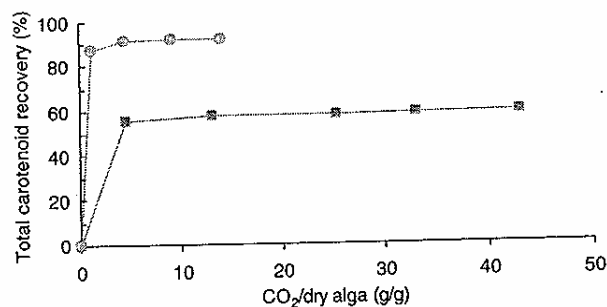


Fig. 2 Recovery of total carotenoids as a function of CO₂ amount, with ethanol as a co-solvent, at 60 °C and 300 bars, for different degrees [degree 1 (■) and degree 2 (●)] of crushing

Effect of pressure and temperature

Figure 3 shows that the extraction yield improves with pressure at the temperature of 60 °C, and a slight increase occurred with temperature, at the pressure of 300 bar. The solubility of the solutes is influenced by two factors: the density of the solvent (favoured by the pressure, at constant temperature) and the vapour pressure of the solutes (favoured by the temperature). On the other hand, the solvent density decreases with the temperature, at constant pressure. The solubility will change according to the predominant factor.

Carotenoids quantification and identification

Table 2 shows the carotenoids composition of *H. pluvialis* biomass acetone extracts, where the dominant pigments are the astaxanthin esters (mono- and di-esters), followed by β -carotene, lutein, canthaxanthin and free astaxanthin.

Figure 4 represents the total astaxanthin (free plus esters) recovery as a function of supercritical CO₂ amount, showing the beneficial effects of ethanol, as a co-solvent. On the other hand, the degree of crushing of the biomass, is also important in the recovery of these carotenoids.

Figure 5 shows the recovery of the extracted β -carotene as a function of CO₂ amount. The effect of the alga crushing and of the ethanol, as a co-solvent, is notorious in the im-

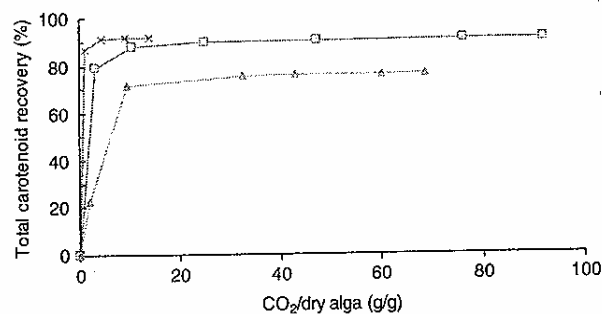


Fig. 3 Recovery of total carotenoids as a function of CO₂ amount, with ethanol as a co-solvent, at different pressures and temperatures. 200 bar, 60 °C (▲), 300 bar, 40 °C (■) and 300 bar, 60 °C (×)

Table 2 Carotenoids composition of the *Haematococcus pluvialis* biomass of acetone extracts

Carotenoids	%
Free astaxanthin	1.7
Lutein	3.3
Canthaxanthin	2.2
Astaxantina esters	73.3
β -carotene	7.2
Total astaxanthin	75.0
Others	12.2

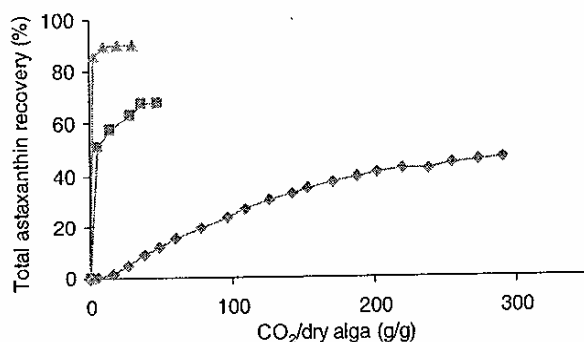


Fig. 4 Recovery of total astaxanthin (free plus esters) as a function of CO₂ amount with (■) and without (◆) ethanol as a co-solvent and degree 1, and CO₂ with ethanol and degree 2 (▲) at 60 °C and 300 bar

provement of the carotenoid recovery, which reached more than 95%. The similar behaviour occurred for the canthaxanthin and lutein. Crushing of the alga seems to be the most important factor for the recovery of the several carotenoids, although for canthaxanthin the obtained recovery (85%) is lower than that obtained for the other carotenoids. This behaviour can suggest that this carotenoid is more strongly bound to the algal structure. Valderrama et al. [9] also submitted *H. pluvialis* to SFE and observed that the degree of crushing was the main factor for increasing the total extract. However, the content of astaxanthin in this extract was markedly favoured by the solvent properties (use of ethanol as a co-solvent).

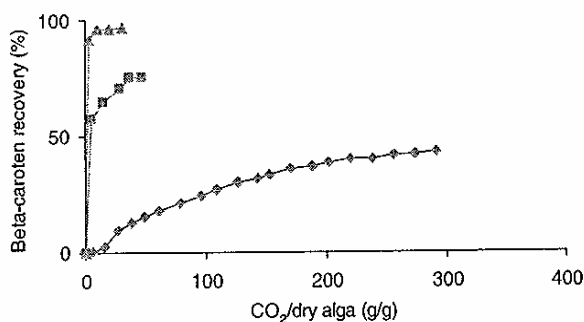


Fig. 5 Recovery of β -carotene as a function of CO₂ amount with (■) and without (◆) ethanol as a co-solvent and degree 1, and CO₂ with ethanol and degree 2 (▲) at 60 °C and 300 bar

Conclusions

Pigments of *H. pluvialis*, the best astaxanthin-producing organism (1.8 mg/g dry biomass), can be obtained by SFE, a green technology. The highest carotenoid recovery (92%) obtained by this separation technique in our experiments was achieved at the pressure of 300 bar and the temperature of 60 °C, using ethanol (10%) as a co-solvent.

The extraction recovery increased with the pressure at constant temperature. On the contrary, the increase of temperature, at constant pressure, led to a slight improvement at 300 bar. The main carotenoid of *H. pluvialis* is the esterified astaxanthin (about 73%). Other carotenoids present are lutein, astaxanthin (free), β -carotene and canthaxanthin. All of them were recovered through supercritical fluid extraction with values higher than 90%, with the exception of canthaxanthin (about 85%), at a pressure of 300 bar and a temperature of 60 °C, using ethanol as a co-solvent.

Acknowledgements This work was supported by FCT (Portugal), Project POCTI/MAR/15237/1999. B. Nobre and F. Marcelo thank FCT (Portugal) for the research grants. R. Passos thanks CAPES (Brasil) for the research grant. The authors thank Graça Conceição for microalgal biomass production.

References

- Dufossé L, Galaup P, Yaron A, Arad SM, Blanc P, Murthy KNC, Ravishankar GA (2005) *Trends Food Sci Tech* 16:389–406
- Margalith PZ (1999) *Appl Microbiol Biotechnol* 51:431–438
- Torrissen OJ, Hardy RW, Shearer KD (1989) *CRC Crit Rev Aquat Sci* 1:209–225
- Gomes E, Dias J, Silva P, Valente L, Empis J, Gouveia L, Bowen J, Young A (2002) *Eur Food Res Technol* 214:287–293
- Gouveia L, Rema P, Pereira O, Empis J (2003) *Aquac Nutr* 9:123–129
- Gouveia L, Raymundo A, Batista AP, Sousa I, Empis J (2005) *Eur Food Res Technol*. Available online <http://www.springer.com>
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M (2003) *Trends Biotechnol* 21(5):210–216
- Mendes RL, Fernandes HL, Coelho J, Reis E, Cabral J, Novais J, Palavra A (1995) *Food Chem* 53:99–103
- Valderrama JO, Perrut M, Majewski W (2003) *J Chem Eng Data* 48:827–830
- Orosa M, Torres E, Fidalgo P, Abalde J (2000) *J Appl Phycol* 12:553–556
- Renstrom B, Borch G, Skulberg OM, Liaaen-Jensen S (1981) *Phytochemistry* 20:2561–2564
- Vonshak A (1986) In: Richmond A (ed) *CRC Handbook of microalgal mass culture*, CRC Press, Boca Raton, USA, pp 117–143
- Gouveia L, Empis J (2003b) *Innov Food Sci Emerg Technol* 4:227–233
- Gouveia L, Veloso V, Reis A, Fernandes HL, Empis J, Novais JM (1996) *Biores Technol* 57:157–163
- Mendes RL, Coelho JP, Fernandes HL, Marrucho IJ, Cabral JMS, Novais JM, Palavra AF (1995) *J Chem Tech Biotechnol* 62:53–59
- Davies BH (1976) In: Goodwin TW (ed) *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, vol 2. Academic Press, London, pp 38–165
- Chen H-M, Meyers SP (1984) *JAOCS* 61(6):1045–1047
- Grung M, D'Souza FML, Borowitzka M, Liaaen-Jensen S (1992) *J Appl Phycol* 4:165–171
- Turner C, King JN, Mathiasson L (2001) *J Chromatogr A* 936:215–237

EXTRACTION OF ASTAXANTHIN FROM THE YEAST *PHAFFIA RHODOZYMA* USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AND ORGANIC SOLVENTS

Renata Passos¹, Luís Beirão¹, António Palavra², Beatriz Nobre³, Luisa Gouveia³, Rui Mendes³

1- Departamento de Ciência dos Alimentos, UFSC, Avenida Ademar Gonzaga, 88034, SC, Brasil.

2- Departamento de Engenharia Química, IST, Avenida Rovisco Pais, 1096-001, Lisboa, Portugal.

3- Departamento de Energias Renováveis, INETI, Estrada do Paço do Lumiar, 1649-038, Lisboa,

Portugal.

Abstract

Recently, the capacity of producing astaxanthin—a carotenoid responsible by the orange-red color of many living organisms, namely aquatics (salmons, shrimps, lobsters, etc.)—, in large scale, through microorganisms, such as *Phaffia rodoyzima*, has been explored. Therefore, astaxanthin is largely used in aquaculture. On the other hand, due to its anti-oxidant properties has been also used as nutraceutical and pharmaceutical compound.

Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Phaffia rodoyzima* was carried out, for several operating conditions, in a semi-continuous apparatus. The yeast was previously freeze-dried and ground with a ball mill. The effects of the pressure (200 and 300 bar), temperature (40, 50 and 60 °C) and flow-rate of supercritical solvent (superficial velocities of 1.2 and 2.4 cm/min), as well as the use of ethanol as co-solvent (10%), on the extraction efficiency were assessed. Organic solvent extractions, using acetone, dimethyl sulfoxide and a mixture of methanol and dichloromethane, were also carried out on whole and ground cells.

The extraction with acetone of astaxanthin from ground *Phaffia* led to the highest yield. Supercritical extraction was compared with the extraction with acetone, and the highest yield (93%) was obtained at the pressure of 300 bar, the temperature of 40 °C and using ethanol. The lowest yield (31%) was obtained at the pressure of 200 bar and the temperature of 50 °C, without co-solvent. On the other hand, the extraction yield increased with the pressure at constant temperature. On the contrary, the increase of temperature at constant pressure led to a significant decrease of the yield at 200 bar and to a slight decrease at 300 bar. Furthermore, the yield decreased with the flow rate, at the pressure of 300 bar and the temperature of 40 °C.