

Fabiana Ourique da Silva

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS  
CAROTENÓIDES TOTAIS EXTRAÍDOS DO MÚSCULO DE  
CAMARÕES CULTIVADOS *Litopenaeus vannamei*

FLORIANÓPOLIS  
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Fabiana Ourique da Silva

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS  
CAROTENÓIDES TOTAIS EXTRAÍDOS DO MÚSCULO DE  
CAMARÕES CULTIVADOS *Litopenaeus vannamei*

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição da Universidade Federal  
de Santa Catarina, como requisito  
para obtenção do grau de Mestre.

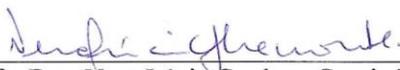
Prof<sup>ª</sup>. Orientadora: Dra. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte

FLORIANÓPOLIS - SC  
2010

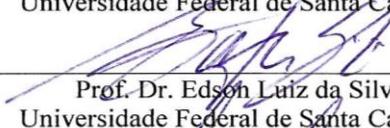
FABIANA OURIQUE DA SILVA

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS  
CAROTENÓIDES TOTAIS EXTRAÍDOS DO MÚSCULO DE  
CAMARÕES CULTIVADOS *Litopenaeus vannamei*

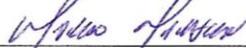
Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição da Universidade Federal  
de Santa Catarina, como requisito  
para obtenção do grau de Mestre.



\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte – Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edson Luiz da Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Maraschin  
Universidade Federal de Santa Catarina



\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Sandra Regina Paulon Avancini  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 07 de maio de 2010.

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S586a Silva, Fabiana Ourique da  
Avaliação in vitro da atividade antioxidante dos  
carotenóides totais extraídos do músculo de camarões  
cultivados *Litopenaeus vannamei* [dissertação] / Fabiana  
Ourique da Silva ; orientadora, Vera Lúcia Cardoso Garcia  
Tramonte. - Florianópolis, SC 2010.  
96 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Carotenóides. 3. Astaxantina. 4.  
Camarão. 5. Antioxidantes. 6. Estresse Oxidativo. I.  
Tramonte, Vera Lucia Garcia Cardoso. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição. III. Título.

CDU 612.39

*Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais, Floriano e Fátima; meus mestres na escola da vida.*

*“O saber se aprende com os mestres e os livros. A sabedoria,  
com o corriqueiro da vida.”*

*Cora Coralina*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida, pelas oportunidades a mim proporcionadas e pelas pessoas que colocou no meu caminho. Pessoas que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelos valores, ensinamentos e apoio sempre incondicional em todas as minhas decisões. Por, mesmo que distantes, serem o meu porto seguro em todos os instantes. Por participarem, com incentivo e motivação de todos os meus sonhos tornando-os mais fáceis de se concretizarem. Mas, acima de tudo pelo exemplo de luta, perseverança, fé e amor.

À minha irmã e amiga Fernanda pelo carinho, pelas “sábias palavras” de conforto e apoio sempre que necessárias e pelo exemplo diário. Tu és um orgulho pra mim!

Às minhas queridas e amadas sobrinhas Ana Carolina e Valentina, pelo carinho e amor dedicados a mim. Vocês é que me fazem lembrar a cada dia as coisas que realmente são importantes. Vocês são os amores da minha vida...

À minha querida madrastra Lucimary por seu carinho, atenção e palavras amigas e motivadoras sempre que precisei. Você é muito especial!

Ao meu cunhado Vinícius pela amizade e pelas ajudas nos conhecimentos de informática, mesmo que nos seus momentos de folga.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Tramonte, minha orientadora, pela confiança em mim depositada ao me aceitar como sua orientanda sem me conhecer. Obrigada pelo incentivo, apoio e amizade conquistada durante esses dois anos de convivência!

Ao Prof. Dr. Edson Luiz da Silva com quem tive a oportunidade de conhecer o verdadeiro significado da palavra Mestre. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela atenção, pelo apoio, compreensão... As suas lições e virtudes com certeza irão me influenciar como profissional e como pessoa para toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Maraschin pela disposição permanente e apoio incondicional em colaborar com a elaboração deste projeto.

À Profa. Dra. Sandra Avancini pelo carinho e apoio sempre!

À minha grande amiga e “co-orientadora” Jane Parisenti não tenho palavras para descrever todo o meu agradecimento. Obrigada por tratar a minha dissertação como se fosse tua! A tua ajuda, companheirismo, incentivo e generosidade fizeram de ti o meu “braço direito”, sem o qual eu não conseguiria prosseguir.

À minha colega de laboratório em Santa Maria/RS, que se tornou minha amiga, minha irmã, meu anjo da guarda, minha mestra Juliana Fabris... Obrigada por estar sempre ao meu lado, por me apoiar, incentivar, por guiar os meus passos, por revisar meus trabalhos, ajudar na estatística, discutir resultados... À minha amiga-irmã Caroline Gonzatto obrigada pelo carinho, atenção, companheirismo, pelos momentos de descontração. Ju e Carol, obrigada por estarem presentes nos momentos que mais precisei. Obrigada por serem tão especiais e amigas maravilhosas! Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao Grupo Dimed/PanVel, aqui representado pelas gerentes Adriana Del Grossi, Michele Oto e Márcia Minatto, pela confiança em mim e no meu trabalho mesmo sabendo das minhas dificuldades de horário em virtude do mestrado. Em especial, à gerente-farmacêutica Michele Oto, que a partir de um relacionamento profissional surgiu uma grande e sincera amizade. Mi, o que aprendi e aprendo contigo, com o teu caráter, tua generosidade e humanismo com certeza me influenciarão no âmbito profissional e pessoal, sempre. Não tenho palavras para agradecer tudo o que fizeste por mim. Obrigada por ser essa chefe, amiga e agora irmã maravilhosa que és! Amigos como tu e o Gustavo é que fazem a diferença na minha vida!

Às minhas colegas de mestrado e amigas, Amanda e Samanta, pela convivência, e amizade conquistada nestes dois anos de convívio.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Nutrição pelos ensinamentos que me foram passados e ao Nelson, secretário do curso, pelo atendimento e auxílio sempre prestados com boa vontade.

À bolsista Camila Brito pela ajuda em alguns momentos do desenvolvimento deste trabalho e a todos os colegas do NEPNE (Núcleo de Estudos e Pesquisa em Nutrição Experimental) pela amizade.

“Agradecer é admitir que houve momentos em que se precisou de alguém; é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente.

Ninguém cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor...”

*Fabiana Ourique da Silva*

## RESUMO

Os carotenóides têm sido bastante investigados como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos. A astaxantina é um carotenóide do grupo das xantofilas, de ocorrência natural em algas, peixes e frutos do mar, sendo o camarão uma de suas principais fontes alimentares. Sua atividade antioxidante parece ser muito superior àquela dos demais carotenóides. No presente estudo foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides totais (CT) extraídos do músculo de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em cativeiro, utilizando-se como parâmetros a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e a co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, utilizando-se a astaxantina sintética como padrão. Foram utilizados dois grupos de camarões: camarão controle (CC) que recebeu ração controle não suplementada, com 3 ppm de carotenóides e camarão suplementado (CS) que recebeu ração contendo 60 ppm de carotenóides provenientes da alga *Haematococcus pluvialis*. Após 30 dias de tratamento, os camarões foram capturados, extraídos os carotenóides totais e realizada a quantificação da astaxantina. Soro e homogenato de fígados extraídos de ratos Wistar adultos foram incubados com os agentes oxidantes  $\text{CuCl}_2$  0,1 mM e 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) 5 mM, na presença ou ausência dos carotenóides oriundos dos camarões, nas concentrações 0, 0,25, 1,25, 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ . Posteriormente foram realizadas as medidas de TBARS. Para a análise de DPPH utilizaram-se as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  de carotenóides totais, enquanto que para a co-oxidação foram utilizadas as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  de carotenóides totais. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias (ANOVA) com medidas repetidas, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$ . Nas análises de TBARS, no soro e homogenato de fígado, após a indução da oxidação com  $\text{CuCl}_2$  e AAPH observa-se que a proteção contra a lipoperoxidação dos CT extraídos do CS foi semelhante àquela obtida com a astaxantina sintética, principalmente nas concentrações mais elevadas (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ), indicando um perfil concentração-resposta. Nas análises de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, os CT extraídos dos camarões do grupo CC não apresentaram atividade antioxidante nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$ , enquanto que os CT extraídos do grupo CS mostraram uma atividade antioxidante estatisticamente semelhante

àquela da astaxantina sintética para ambas as concentrações testadas. Para o seqüestro do radical livre DPPH, observou-se novamente um possível efeito concentração-resposta dos CT extraídos dos grupos CC e CS, onde os CT do grupo CS apresentaram uma capacidade de seqüestrar o radical DPPH semelhante àquela da astaxantina sintética (aproximadamente 75%), apesar da diferença estatística. Ainda, os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicam não haver diferença nos níveis de astaxantina nos dois grupos de camarões (CC e CS), sendo este o carotenóide majoritário nos crustáceos de ambos os grupos. Foi observada uma maior atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides extraídos dos camarões que receberam uma suplementação de astaxantina na ração (grupo CS). Neste grupo, o efeito protetor da astaxantina pode ter evitado a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e colesterol nos crustáceos, evitando desta forma a presença de compostos oxidados nos extratos. No grupo CC, com menor teor de astaxantina, uma maior concentração de compostos oxidados presentes nos extratos poderia estar interferindo nas análises. Os carotenóides do grupo suplementado exerceram uma maior proteção contra a lipoperoxidação no soro e homogenato de fígado de ratos, proteção contra a oxidação de um ácido graxo poliinsaturado e maior atividade no seqüestro de radicais livres. A partir destes resultados observados *in vitro* novos estudos devem ser conduzidos com o intuito de verificar os possíveis efeitos benéficos *in vivo* do consumo de alimentos que possuam astaxantina como o carotenóide majoritário, como o camarão.

**Palavras-chave:** carotenóides, astaxantina, camarões *Litopenaeus vannamei*, antioxidante, DPPH, TBARS, ácido linoléico, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Carotenoids have been extensively investigated as chemopreventive agents acting as antioxidants in biological systems. Astaxanthin is a carotenoid which belongs to the group of the xanthophylls, naturally occurring in some algae, fish and seafood, including shrimp, one of its major food source. Its antioxidant activity seems to be much higher than the other carotenoids. In the present study, the *in vitro* antioxidant activity of total carotenoids (TC) from the muscles of *Litopenaeus vannamei* shrimp cultivated in farmland was conducted by means of the measurement of some parameters, as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as the scavenger of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and as the co-oxidation of  $\beta$ -carotene/linoleic acid, using synthetic astaxanthin as standard. Two groups of shrimps were evaluated: control shrimp (CS) treated with non-supplemented control chow containing 3 ppm of carotenoids, and supplemented shrimp (SS) which received chow containing 60 ppm of carotenoids obtained from *Haematococcus pluvialis* algae. After 30 days of treatment, shrimp were collected, total carotenoids content were extracted and the amount of astaxanthin was quantified. Serum and liver samples obtained from adult *Wistar* rats were incubated with the oxidant agents  $\text{CuCl}_2$  0,1 mM and 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) 5 mM, in the absence or presence of different concentrations of the shrimp carotenoids (0, 0.25, 1.25, 2.5 and 5  $\mu\text{M}$ ). Afterwards, the measurement of TBARS production was conducted. In order to perform the analysis of DPPH, two different concentrations (5 and 10  $\mu\text{M}$ ) of total carotenoids were utilized, whereas 10 and 20  $\mu\text{M}$  of total carotenoids were used for the co-oxidation assay. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Data were analysed with two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements followed by Bonferroni's *post-hoc* test. The level of significance was considered when  $P < 0.05$ . Considering TBARS analysis after the induction of oxidation with  $\text{CuCl}_2$  and AAPH, in both serum and liver samples, it was observed that the protection against lipid peroxidation observed for TC from SS was similar to the protection observed for synthetic astaxanthin, mainly when considering the highest concentrations tested (2.5 and 5  $\mu\text{M}$ ), indicative of a concentration-dependent effect. When evaluating the analysis of the co-oxidation of  $\beta$ -carotene/linoleic acid, TC obtained from CS did not present antioxidant activity in any of the concentrations tested (10 and 20  $\mu\text{M}$ ), whereas TC from SS demonstrated an

antioxidant activity, with both concentrations tested, statistically similar to the activity observed for synthetic astaxanthin. Considering the scavenger of the DPPH free radical assay, it was observed again a possible concentration-dependent effect for the TC of CS and SS, where the latter presented ability to scavenge the DPPH radical statistically similar to the one observed for synthetic astaxanthin (about 75%). Furthermore, results obtained from high performance liquid chromatography (HPLC) did not indicate differences in the level of astaxanthin in shrimps of both CS and SS, considering that astaxanthin is the major carotenoid present in the crustacean of both groups. It was observed a greater *in vitro* antioxidant activity for the carotenoids obtained from the shrimp which had received astaxanthin-supplemented chow. In such group, the protector effect attributed to astaxanthin could have prevented the oxidation of polyunsaturated fatty acids and cholesterol presented in the shrimps, avoiding, in this manner, the presence of oxidized compounds in the extracts. In the CS, presenting less amount of astaxanthin, a higher concentration of oxidized compounds presented in the extracts could have been interfering in the analysis. Moreover, carotenoids of the supplemented group exerted a higher protection against lipid peroxidation in the serum and liver samples of rats, protection against oxidation of a polyunsaturated fatty acid and a higher free radicals scavenger activity. From the present results observed *in vitro*, further additional studies must be conducted aiming to verify the *in vivo* possible beneficial effects of the consumption of food containing astaxanthin as the major carotenoid, as in shrimp.

**Keywords:** carotenoids, astaxanthin, *Litopenaues vannamei* shrimp, antioxidant, DPPH, TBARS, linoleic acid, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química de carotenóides (HIGUERA-CIAPARA <i>et al.</i> , 2006) .....	22
<b>Figura 2:</b> Estrutura molecular da astaxantina (MCNULTY <i>et al.</i> , 2008).	25
<b>Figura 3:</b> Possível mecanismo de ação da astaxantina (PASHKOW <i>et al.</i> , 2008) .....	29
<b>Figura 4:</b> Principais espécies radicalares geradas <i>in vivo</i> (BARTOSZ, 2008).....	36
<b>Figura 5:</b> Esquema simplificado do sistema oxidante nas células (NORDBERG & ARNÉR, 2001) .....	38
<b>Figura 6:</b> Reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica (LIMA & ABDALLA, 2001) .....	42

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Composição das rações controle e suplementada .....	49
<b>Tabela 2:</b> Sistema de incubação para a indução da peroxidação lipídica no soro diluído 20x.....	53
<b>Tabela 3:</b> Sistema de incubação para a indução da peroxidação lipídica em homogenato de fígado .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloro
ABCC	Associação Brasileira dos Criadores de Camarão
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
BHT	Butilhidroxitolueno
CAT	Catalase
CC	Camarão Controle
-CH <sub>2</sub> -	Grupo metileno
CS	Camarão Suplementado
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX-2	Enzima ciclooxigenase-2
CT	Carotenóides Totais
CuCl <sub>2</sub>	Cloreto de cobre
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
MDA	Malondialdeído
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina reduzida
NF-κB	Fator nuclear – κB
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Radical dióxido de nitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>3</sub>	Ozônio

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical superóxido
OH	Grupo hidroxila
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxila
ONOO $^-$	Peroxinitrito
RO $\bullet$	Radical alcoxila
ROO $\bullet$	Radical peroxila
ROOH	Hidroperóxidos lipídicos
SEAP	Secretaria Especial da Aqüicultura e Pesca
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UV	Radiação ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	13
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	14
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	22
<b>2.1. Carotenóides</b> .....	22
2.1.1. Características químicas e fontes dietéticas .....	22
2.1.2. Metabolismo .....	23
2.1.3. Atividades biológicas .....	24
<b>2.2. Astaxantina</b> .....	25
2.2.1. Definição e características químicas .....	25
2.2.2. Principais fontes .....	26
2.2.3. Metabolismo .....	27
2.2.4. Propriedades e funções biológicas .....	28
<b>2.3. Camarão</b> .....	32
2.3.1. Panorama mundial e regional da produção de camarão .....	32
2.3.2. Forma de obtenção de astaxantina por camarões e suas funções .....	34
<b>2.4. Agentes oxidantes, estresse oxidativo, peroxidação lipídica e antioxidantes</b> .....	35
2.4.1. Agentes oxidantes: radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio .....	35
2.4.2. Estresse oxidativo: definição e possíveis efeitos no organismo.....	38
2.4.3. Peroxidação lipídica .....	40
2.4.4. Antioxidantes .....	44
2.4.5. Métodos para avaliação da capacidade antioxidante .....	45
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	47
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	47
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	47
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
<b>4.1. Materiais e reagentes</b> .....	48
<b>4.2. Cultivo dos camarões <i>Litopenaeus vannamei</i></b> .....	48
4.2.1. Preparo das rações .....	49
<b>4.3. Extração dos carotenóides totais do músculo dos camarões cultivados</b> .....	50

<b>4.4. Quantificação dos carotenóides totais .....</b>	50
<b>4.5. Quantificação da astaxantina no extrato carotenóidico .....</b>	51
<b>4.6. Preparo das soluções para as análises da capacidade antioxidante.....</b>	51
<b>4.7. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antioxidante dos carotenóides totais .....</b>	52
4.7.1. Análise de proteção contra a peroxidação lipídica <i>in vitro</i> ....	52
4.7.1.1. Preparação do soro e homogenato de fígado .....	52
4.7.1.2. Indução da peroxidação lipídica no soro e homogenato de fígado.....	53
4.7.1.3. Medidas de TBARS .....	54
4.7.2. Análise da capacidade de seqüestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) .....	55
4.7.3. Determinação da atividade antioxidante a partir do sistema da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico .....	56
<b>4.8. Análise estatística .....</b>	56
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	58
<b>Manuscrito .....</b>	59
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	89

## 1. INTRODUÇÃO

Os carotenóides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza, cuja coloração varia do amarelo ao vermelho intenso. São encontrados em frutas, vegetais, bactérias, fungos e algas, os quais têm a capacidade de sintetizar esses compostos (STAHL & SIES, 2003). Seu potencial biológico está fortemente relacionado à sua atividade antioxidante, pois têm a capacidade de agir no seqüestro de radicais livres e inativação dos mesmos (PALOZZA & KRINSKY, 1992). Isso se reflete no fato de que o consumo de carotenóides oriundos de alimentos tem se mostrado como uma estratégia promissora no combate ao estresse oxidativo (TAPIERO, 2004; RAO & RAO, 2007).

Os radicais livres, como hidroxil e peroxil, e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), são formados a partir de processos fisiológicos e bioquímicos no organismo humano, como parte de seu metabolismo normal (HALLIWELL, 1994b). No entanto, o estresse fisiológico, poluição, cigarro e radiação ultravioleta são alguns dos fatores exógenos que podem levar a um aumento na produção desses agentes oxidantes. Quando em excesso, causam o estresse oxidativo e devido à sua alta reatividade, podem reagir com biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios, causando danos oxidativos através de uma série de reações em cadeia (DI MASCIO *et al.*, 1991). Estas reações de oxidação, segundo alguns autores, estão envolvidas na progressão de patologias como aterosclerose (LUSIS, 2000), câncer (SERRANO & BLASCO, 2007); diabetes (HOUSTIS *et al.*, 2006), doenças neurodegenerativas (ESPOSITO *et al.* 2002) entre outras, bem como o processo de envelhecimento.

Tem sido relatado na literatura científica o papel dos carotenóides na prevenção e/ou tratamento de algumas enfermidades (GEORGE *et al.*, 2009; RICCIONI, 2009; KOH *et al.*, 2010). No entanto, nos últimos anos, o carotenóide astaxantina tem recebido especial atenção da comunidade científica. A astaxantina é um pigmento carotenóide de ocorrência natural em algumas algas, peixes e frutos do mar, sendo responsável pela coloração laranja-avermelhada dos mesmos. Pertence ao grupo das xantofilas e caracteriza-se pela presença de átomos de oxigênio em sua estrutura química (BRITTON, 1995). A presença de grupos cetona e hidroxila nas extremidades da cadeia carbonada tornam a astaxantina menos apolar que os demais carotenóides e faz com que ela seja encontrada na natureza conjugada a proteínas ou esterificada com ácidos graxos (HUSSEIN *et al.*, 2006b). Autores relatam que a configuração química diferenciada da astaxantina seria a responsável

pela sua elevada capacidade antioxidante, quando comparada aos demais carotenóides e a algumas vitaminas (MIKI, 1991; NAGUIB, 2000). Ainda, devido à sua estrutura lipofílica, exerce suas propriedades antioxidantes em membranas celulares (KURASHIGE *et al.*, 1990; IWAMOTO *et al.*, 2000), principalmente na captura de agentes oxidantes que possam causar danos em biomoléculas. Estas características podem estar envolvidas na prevenção e/ou tratamento de doenças como diabetes (MANABE *et al.*, 2008), câncer (CHEW, 1999), doenças oculares (O'CONNOR & O'BRIEN, 1998), hipertensão (HUSSEIN *et al.*, 2006a) e doenças cardiovasculares (PASHKOW *et al.*, 2008).

Miki (1991) e Naguib (2000) verificaram que a astaxantina possui uma ação antioxidante entre 100 e 500 vezes maior que outras moléculas antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno. A partir de então, pesquisas têm sido realizadas no sentido de elucidar a possível influência deste carotenóide na prevenção ou tratamento de diversas doenças. No entanto, para tais pesquisas tem sido utilizada astaxantina proveniente da alga *Haematococcus pluvialis*, uma das principais fontes desta xantofila, ou astaxantina sintética, não sendo encontrados estudos sobre o efeito da astaxantina proveniente de alimentos. No início da década de 90, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou, nos Estados Unidos, o uso de astaxantina como um nutracêutico (GUERIN *et al.*, 2003). Porém, no Brasil, ainda não se obteve a liberação por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a utilização de astaxantina como um suplemento alimentar.

Tolasa *et al.* (2005) demonstraram que 100 g de filé de salmão contêm 676  $\mu$ g de astaxantina. Porém, 100 g de camarão contêm 11000  $\mu$ g de astaxantina, conforme descrito por Boonyaratpalin *et al.* (2001), sendo esse uma das principais fontes alimentares dessa xantofila.

Alguns relatos da literatura condenam o consumo alimentar freqüente de camarão devido ao seu alto teor de colesterol. Segundo King *et al.* (1990), os camarões possuem 93% de seus esteróis na forma de colesterol, fato que poderia ser prejudicial à integridade vascular. No entanto, em um estudo realizado por Childs *et al.* (1990), foi verificado que o consumo de camarão não alterou as concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL – *Low Density Lipoprotein*) no sangue de indivíduos normolipidêmicos. Em um trabalho realizado por Freygang *et al.* (2008) para a determinação do colesterol e ácidos graxos de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados e o efeito do seu consumo no perfil lipídico em ratos, os autores verificaram que esses camarões apresentaram um elevado teor de proteínas e reduzido teor de gordura e

o consumo desses camarões não alterou as concentrações de lipoproteínas no plasma dos animais. Sendo assim, sugeriu-se que o consumo desses crustáceos poderia não ser prejudicial à saúde, desde que se atente para a forma de preparo culinário dos mesmos.

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2009) o camarão é o mais importante e rentável entre todos os alimentos marinhos cultivados e comercializados. Representam 7% do volume de pescados comercializados mundialmente, movimentando 17% do valor econômico dos produtos de pesca, sendo um produto com grande valor agregado e consumido no mundo todo. Atualmente, 70% dos camarões consumidos no mundo provem de fazendas de cultivo.

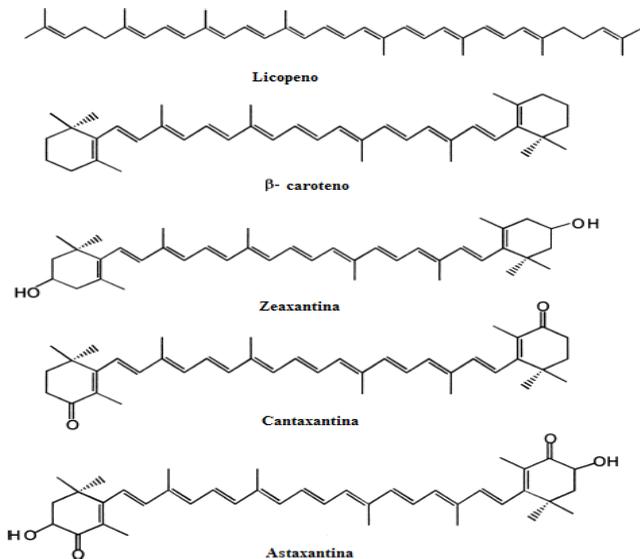
Conforme o exposto anteriormente, os camarões são considerados uma fonte alimentar de carotenóides, sendo a astaxantina o carotenóide majoritário. Segundo a literatura científica, o efeito desta xantofila tem se mostrado eficaz na prevenção e, possivelmente, tratamento de algumas doenças (GUERIN *et al.*, 2003; HUSSEIN *et al.*, 2006b; PASHKOW *et al.*, 2008; KAMATH *et al.*, 2008). No entanto, há uma carência de dados científicos concernentes ao papel da astaxantina proveniente de uma fonte alimentar contra o estresse oxidativo. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo central avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides totais extraídos do músculo de camarões *Litopenaeus vannamei* (principal parte comestível desse crustáceo), utilizando diferentes métodos, com diferentes mecanismos de ação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Carotenóides

#### 2.1.1. Características químicas e fontes dietéticas

Os carotenóides são pigmentos naturais cuja coloração varia do amarelo ao vermelho intenso. Somente plantas (frutas e vegetais), bactérias, fungos e algas têm a capacidade de sintetizar estes compostos (STAHL & SIES, 2003). A maioria dos carotenóides é derivada de uma estrutura basal com 40 átomos de carbono. Possuem uma estrutura poliisoprenóide, uma longa cadeia carbônica com duplas ligações conjugadas e uma simetria bilateral similar em torno da dupla ligação central (BRITTON, 1995) (Figura 1). Os diferentes carotenóides são derivados por modificações desta estrutura básica, resultante da ciclização dos grupos nas extremidades da cadeia e pela introdução de átomos de oxigênio, sendo estas características responsáveis pela coloração e propriedades biológicas dos mesmos (MOREIRA & SHAMI, 2004).



**Figura 1:** Estrutura química de carotenóides (adaptado de HIGUERA-CIAPARA *et al.*, 2006).

Conforme sua estrutura química, os carotenóides são divididos em duas grandes classes: os carotenos, cuja molécula possui apenas átomos de carbono e hidrogênio e os oxicarotenóides (xantofilas), os quais possuem no mínimo um átomo de oxigênio (TAPIERO *et al.*, 2004). O oxigênio pode estar presente nos grupos hidroxila (-OH), como na zeaxantina, como oxi-grupos, como na cantaxantina, ou uma combinação de ambos os grupos, como no caso da astaxantina (HIGUERA-CIAPARA *et al.*, 2006). Devido à presença das duplas ligações conjugadas na cadeia poliênica, diversas configurações *cis/trans* são possíveis para uma mesma molécula do carotenóide. Apesar de os isômeros *trans* serem mais comuns nos alimentos e mais estáveis, muito pouco é conhecido sobre a significância biológica da isomerização dos carotenóides na saúde humana. Algumas das principais fontes de carotenóides são cenouras e abóboras ( $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno), tomate e seus derivados (licopeno), espinafre (luteína), laranja ( $\beta$ -criptoxantina) e algumas espécies de salmão e crustáceos que acumulam astaxantina produzida por algas.

### 2.1.2. Metabolismo

Para melhor entender os benefícios do consumo de carotenóides a partir da dieta, ou de suplementos alimentares, estudos têm focado na absorção, distribuição e metabolismo de alguns desses compostos em seres humanos (PARKER, 1996; ZARIPHEH, 2002).

Os carotenóides ingeridos são incorporados em micelas formadas por gorduras dietéticas e ácidos biliares, sendo assim absorvidos na mucosa intestinal por difusão passiva. São incorporados em quilomícrons e liberados no sistema linfático e, posteriormente, na circulação sanguínea, são transportados até o fígado. A partir de então, na corrente sanguínea, os carotenóides são transportados por outras lipoproteínas como a lipoproteína de alta densidade (HDL – *High Density Lipoprotein*), a lipoproteína de baixa densidade (LDL – *Low Density Lipoprotein*) e a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL – *Very Low Density Lipoprotein*) aos diferentes órgãos (PARKER, 1996). A lipofilicidade desses compostos também influencia em sua absorção, transporte e excreção no organismo (STAHL *et al.*, 1993). A biodisponibilidade dos carotenóides é baixa. Uma das possíveis explicações para este fato é que, por serem compostos lipofílicos, provavelmente ocorra uma limitação na dissolução dos mesmos pelos fluidos gastrointestinais (ODEBERG *et al.*, 2003). Porém, estudos

sugerem que a co-administração de carotenóides e compostos lipídicos aumenta a biodisponibilidade desses compostos (OLSON, 1994; ROCK, 1997).

Pelo fato de serem moléculas lipofílicas, tendem a se acumular em compartimentos lipofílicos como membranas, lipoproteínas e tecido adiposo (ERDMAN *et al.*, 1993; VAN HET HOF *et al.*, 2000).

### 2.1.3. Atividades biológicas

Aproximadamente 600 carotenóides já foram identificados na natureza, os quais são sintetizados por plantas, algas e fungos (GOODWIN, 1980). A função primária dessas substâncias é absorver luz durante a fotossíntese em plantas, ou fotoproteção em microorganismos (TAPIERO *et al.*, 2004). No entanto, dos 40 carotenóides que estão presentes na dieta humana, apenas 20 têm sido identificados no soro e tecidos (RAO & RAO, 2007).

O potencial biológico dos carotenóides está fortemente relacionado com sua estrutura molecular (BRITTON, 1995). O padrão de duplas ligações conjugadas na cadeia poliênica determina suas propriedades de absorção da luz e influencia na capacidade antioxidante destes compostos (STAHL & SIES, 2003). Testes *in vitro* e *in vivo* sugerem que os carotenóides são excelentes antioxidantes uma vez que sequestram e inativam os radicais livres (LEE & MIN, 1990; BRITTON, 1995; ERDMAN, 1999; GOTO *et al.*, 2001). Ainda, são efetivos desativadores de moléculas excitadas eletronicamente, as quais estão envolvidas na geração de radicais livres (YOUNG & LOWE, 2001). O mecanismo pelo qual os carotenóides protegem os sistemas biológicos dos radicais depende da transferência de energia do radical para a molécula do carotenóide, em que a energia é dissipada por meio de rotações e vibrações da molécula do carotenóide no meio solvente (STAHL & SIES, 2003).

As propriedades antioxidantes dos carotenóides têm sido sugeridas como o principal mecanismo pelos quais estes desempenham seus efeitos benéficos (ASTROG *et al.*, 1997; PAIVA & RUSSELL, 1999; JOHNSON, 2002; ELLIOT, 2005). Devido à sua lipofilicidade e propriedades específicas de sequestrar radicais peróxido, acredita-se que os carotenóides desempenhem um importante papel na proteção de membranas celulares e lipoproteínas contra os danos oxidativos (SIES & STAHL, 1995).

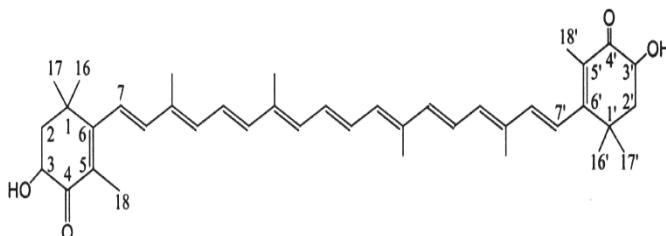
Segundo Halliwell (1994), antioxidantes provenientes da dieta são capazes de inativar espécies reativas de oxigênio, desta forma protegendo o organismo contra danos oxidativos causados em biomoléculas. Além dos efeitos antioxidantes, estudos revelam que esses compostos podem atuar também através de outros mecanismos como regulação do crescimento celular, modulação da expressão gênica e resposta imune (BERTRAM, 1999; OLSON, 1999; JEWELL & O'BRIEN, 1999; STAHL & SIES, 2003).

Baseado no acima exposto, estudos têm relacionado o aumento do consumo de uma dieta rica em carotenóides e a diminuição do risco do desenvolvimento de certas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (NISHINO, 2009; SONG *et al.*, 2009; LARSSON *et al.*, 2010).

## 2.2. Astaxantina

### 2.2.1. Definição e características químicas

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) é um pigmento carotenóide do grupo das xantofilas (oxicarotenóide) de fórmula molecular  $C_{40}H_{52}O_4$  e peso molecular 596,86. Sua estrutura química é caracterizada por uma longa cadeia hidrocarbonada, com duplas ligações conjugadas e com um anel aromático em cada extremidade da cadeia. A presença de grupos hidroxila (-OH) e átomos de oxigênio nos anéis terminais da cadeia hidrocarbonada da astaxantina (Figura 2) confere uma maior polaridade a este carotenóide quando comparado aos demais.



**Figura 2:** Estrutura molecular da astaxantina (MCNULTY *et al.*, 2008).

Na forma cristalina e pura, apresenta-se como um pó fino de coloração alaranjada escura. Seu ponto de fusão é de aproximadamente

224 °C. Devido ao fato de ser apolar, pode ser solubilizada à temperatura ambiente em solventes não polares como, por exemplo, acetona, clorofórmio e diclorometano. A absorbância máxima da astaxantina ocorre em 489 nm em clorofórmio e acetona (JOHNSON & AN, 1991).

Considerando que a molécula possui dois centros quirais em C-3 e C-3', a astaxantina pode apresentar três configurações isoméricas: dois enantiômeros (3R,3'R e 3S, 3'S) e a forma meso (3R, 3'S) (TURUJMAN *et al.*, 1997). O isômero 3S, 3'S é o mais abundante na natureza. A astaxantina presente em crustáceos é uma mistura das três formas previamente descritas (ARANGO, 1996; OSTERLIE *et al.*, 1999). A astaxantina sintética é uma molécula idêntica à sintetizada em organismos vivos e consiste em uma mistura de isômeros na proporção 1:2:1 (3S,3S'), (3R,3S') e (3R,3R), respectivamente (HIGUERA-CIAPARA *et al.*, 2006).

Dependendo da fonte, a astaxantina poderá ser encontrada formando complexos com proteínas ou esterificada com ácidos graxos, o que confere uma maior estabilidade à molécula, uma vez que a astaxantina livre é muito sensível à oxidação (TAPIERO *et al.*, 2004; HIGUERA-CIAPARA *et al.*, 2006).

### 2.2.2. Principais fontes

A astaxantina é o principal pigmento carotenóide encontrado em seres aquáticos como o camarão, o salmão, a truta e a lagosta. Pode ser encontrada também em aves como o flamingo. Os peixes e os frutos-do-mar acumulam este carotenóide após o consumo de algas sintetizadoras de astaxantina, como a microalga *Haematococcus pluvialis* (JOHNSON & AN, 1991), uma vez que esta representa uma das principais fontes naturais dessa xantofila (LORENZ & CYSEWSKI, 2000).

Nos seres aquáticos, além de conferir a pigmentação alaranjada, a astaxantina exerce funções de proteção contra a oxidação de ácidos graxos e colesterol, proteção contra a radiação UVA e aumento da sobrevivência, entre outras funções (HIGUERA-CIAPARA *et al.*, 2006), sendo amplamente utilizada na alimentação de camarões criados em cativeiro.

### 2.2.3. Metabolismo

Quando ingerida a partir da dieta, a astaxantina é incorporada em micelas no intestino delgado devido à sua pouca solubilidade, difundindo-se passivamente na luz intestinal junto com os ácidos graxos (PARKER, 1996). Ocorre uma melhora em sua absorção intestinal e biodisponibilidade quando administrada concomitantemente com compostos lipídicos (CLARK *et al.*, 2000).

Após a absorção, entra na circulação sanguínea via sistema linfático (WANG *et al.*, 1992). Os principais transportadores de astaxantina no plasma são os quilomícrons (ØSTERLIE *et al.*, 2000; CORAL-HINOSTROZA *et al.*, 2004). Complexada a essa lipoproteína, a astaxantina chega ao fígado onde será catabolizada em seus metabólitos. O mecanismo exato pelo qual a astaxantina é metabolizada nesse órgão ainda é desconhecido, mas sabe-se que a porção não metabolizada da astaxantina é incorporada às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) para ser transportada através da corrente sanguínea aos demais tecidos alvos (ØSTERLIE *et al.*, 2000; RAJASINGH *et al.*, 2006).

Tem sido relatado na literatura que a biotransformação da astaxantina inclui a clivagem da cadeia na posição C9 (WOLZ *et al.*, 1999). Um dos principais metabólitos, (rac)-3-hidroxi-4-oxo- $\beta$ -ione e sua forma reduzida, (rac)-3-hidroxi-4-oxo-7,8-dihidro-  $\beta$ -ione, também têm sido identificados. Esses metabólitos e, adicionalmente o 3-hidroxi-4-oxo-  $\beta$ -ionol bem como o 3-hidroxi-4-oxo-7,8-dihidro-  $\beta$ -ionol foram encontrados no plasma humano após a administração oral de astaxantina (KISTLER *et al.*, 2002).

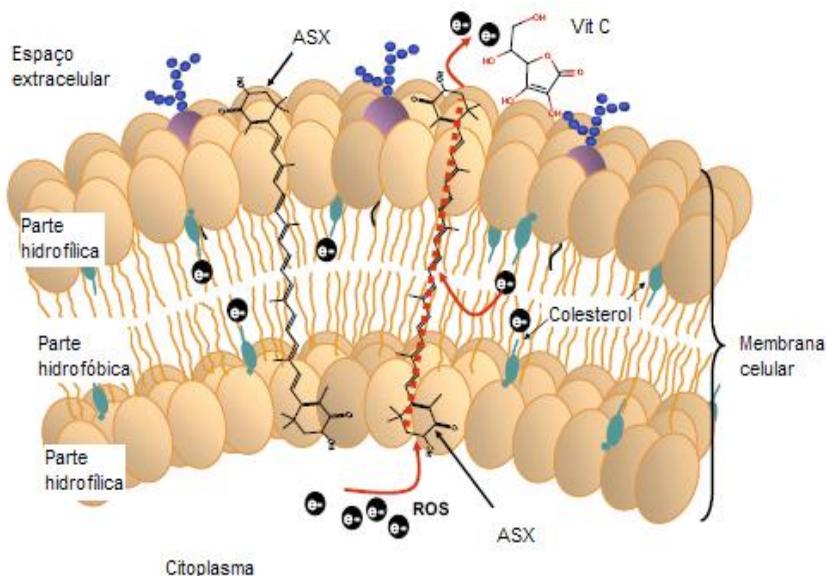
A administração de astaxantina via gavagem, em camundongos, resultou em um acúmulo desse carotenóide no fígado e no plasma (SHOWALTER *et al.*, 2004). Petri & Lundebye (2007), verificaram que as maiores concentrações viscerais de astaxantina foram encontradas no fígado, rins, baço e glândulas adrenais de ratos que receberam diferentes concentrações de astaxantina na dieta por 14 dias, destacando que quanto maior a concentração de astaxantina, maior o acúmulo nos órgãos citados. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Gradelet *et al.* (1996). Jewell & O'Brien (1999) relataram que 300 mg de astaxantina/kg de ração fornecida durante 16 dias resultaram em um acúmulo de astaxantina, no fígado de ratos, que varia entre 8 e 300 vezes. Segundo os pesquisadores, essas diferenças no acúmulo de astaxantina nos animais ocorrem devido às diferenças individuais na absorção como resultado da variabilidade na distribuição no organismo,

que pode ser afetada pelo tempo e quantidade de refeição consumida e subsequente catabolismo e eliminação. Portanto, os autores são unânimes em descrever que o acúmulo de astaxantina em órgãos, principalmente no fígado, está diretamente relacionado à concentração dessa xantofila recebida na dieta e o tempo de consumo da mesma.

A absorção da astaxantina, assim como dos demais carotenóides, é facilitada pela concentração de gordura presente na dieta (PRINCE & FRISOLI, 1993; ODEBERG *et al.*, 2003) e sua melhor solubilidade em lipídios pode implicar em uma melhor incorporação nas micelas intestinais, facilitando assim a sua absorção.

#### 2.2.4. Propriedades e funções biológicas

A astaxantina não apresenta atividade pró-vitamina A como alguns carotenóides, mas possui inúmeras propriedades farmacológicas importantes, que podem estar envolvidas na prevenção ou no tratamento de doenças, como diabetes (MANABE *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009), câncer (BERTRAM E VINE, 2005), doenças de pele – fotoproteção (LYONS & O'BRIEN, 2002), hipertensão (HUSSEIN *et al.*, 2006a) e aterosclerose (SETNIKAR *et al.*, 2005), entre outras. No entanto, pesquisadores relatam que os efeitos protetores da astaxantina contra algumas enfermidades estariam relacionados ao seu elevado potencial antioxidante (HIGUERA-CIAPARA *et al.*, 2006; HUSSEIN *et al.*, 2006b). Comparando com outras substâncias consideradas antioxidantes, como a vitamina C,  $\alpha$ -tocoferol e outros carotenóides, como zeaxantina,  $\beta$ -caroteno, luteína e licopeno, a capacidade da astaxantina em capturar radicais livres é bastante superior, podendo variar entre 100 e 500 vezes maior a das substâncias citadas anteriormente (MIKI, 1995; NAGUIB, 2000; PALOZZA *et al.*, 2008). Essa superioridade estaria relacionada à sua estrutura química, onde os anéis polares da astaxantina ligar-se-iam a espécies reativas de oxigênio na superfície, enquanto a cadeia carbonada agiria no interior da membrana celular, conforme é mostrado na figura 3 (GOTO *et al.*, 2001; PASHKOW *et al.*, 2008). Os grupos hidroxila nos anéis terminais da molécula de astaxantina são apontados como os principais sítios de remoção de radicais livres.



**Figura 3:** Possível mecanismo de ação antioxidante da astaxantina em membranas biológicas (PASHKOW *et al.*, 2008).

Wu *et al.* (2006) verificaram o efeito protetor da astaxantina contra danos oxidativos induzidos por radical hidroxil e oxigênio singlete. Também tem sido demonstrado que peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radical superóxido estimulam a biossíntese da astaxantina em fungos. Provavelmente, isso ocorre como uma resposta de defesa antioxidante nesses organismos (SCHROEDER & JOHNSON, 1995; LIU & WU, 2006).

A potente atividade antioxidante da astaxantina tem sido observada por modular funções biológicas exercendo proteção nos tecidos contra a peroxidação lipídica e os danos causados por esse processo (SANTOCOMO *et al.*, 2006; MCNULTY *et al.*, 2007).

A mitocôndria é o principal local de produção de radicais livres, visto que a energia necessária para o bom funcionamento celular é gerada nesta organela através de múltiplas reações oxidativas. Essas reações são acompanhadas pela produção de uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) assim como radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ). Essas ERO necessitam ser neutralizadas para

que não haja o dano em outros compartimentos celulares. Kurashige *et al.* (1990) verificaram que a astaxantina foi eficaz em prevenir, *in vitro*, a peroxidação em mitocôndrias de hepatócitos de ratos. Esta eficácia foi até 100 vezes maior quando comparada à vitamina E. A superioridade da astaxantina, na proteção de membranas celulares, acredita-se ser devido à sua habilidade em proteger, tanto a interior quanto a parte exterior da membrana, contra danos oxidativos. Isto ocorre pelo fato de que a sua cadeia poliênica e seus anéis terminais, que além de captarem radicais livres, possuem a capacidade de modificar a permeabilidade da membrana (MATSUSHITA, 2000). Ainda, estudos relatam que os carotenóides, incluindo a astaxantina, não são essenciais para a saúde celular apenas por proteger os componentes celulares contra as reações de oxidação, mas também porque exercem um papel na expressão gênica e na indução da comunicação entre células (BERTRAM, 1999).

Estudos têm sido conduzidos para avaliar o efeito da suplementação de astaxantina em vários tipos de câncer. Os resultados mostram que a administração oral de astaxantina inibiu o câncer de bexiga (TANAKA *et al.*, 1994) e o câncer de cólon (TANAKA *et al.*, 1995) em camundongos. Estes efeitos foram atribuídos principalmente à supressão da proliferação celular. Jyonouchi *et al.* (2000) observaram que, quando camundongos eram inoculados com células de fibrosarcoma, a astaxantina presente na dieta dos animais inibiu o crescimento tumoral e estimulou a resposta imunológica contra o tumor. A inibição do crescimento tumoral pela astaxantina mostrou ser dependente da dose administrada deste carotenóide. A astaxantina atenuou a metástase no fígado, induzida pelo estresse em camundongos, aumentando a resposta imune e a inibição da peroxidação lipídica neste órgão (KURIHARA *et al.*, 2002). Palozza *et al.* (2009) verificaram que o extrato da alga *Haematococcus pluvialis*, rica em astaxantina, atuou como um potente inibidor do crescimento de algumas linhagens celulares responsáveis pelo desenvolvimento de câncer de cólon em seres humanos quando avaliadas *in vitro*.

Níveis elevados de LDL-colesterol, o popularmente conhecido “colesterol ruim”, está associado ao aumento do risco de desenvolvimento da aterosclerose. Usualmente, a maior parte da LDL no plasma não está oxidada e sua oxidação está relacionada à progressão da aterosclerose (FREI, 1995). No entanto, o consumo dietético de antioxidantes pode inibir a oxidação da LDL, sendo este um dos possíveis mecanismos de ação dos antioxidantes contra os riscos de progressão da placa ateromatosa. A astaxantina reduziu a oxidação da LDL em seres humanos quando comparada a outros antioxidantes, como

$\alpha$ -tocoferol e luteína, e ao controle que não recebeu tratamento com antioxidantes (IWAMOTO *et al.*, 2000). Setnikar *et al.* (2005) observaram que a astaxantina em combinação com outros agentes antioxidantes exerceu uma alta proteção contra a infiltração de lipídios nas paredes das artérias de coelhos. Em um estudo conduzido por Mason *et al.* (2006), os autores verificaram que a astaxantina inibiu a oxidação da LDL causada por rofecoxibe, um antiinflamatório não esteróide seletivo para a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). A cardioproteção da astaxantina está, provavelmente, relacionada às suas ações antiinflamatórias. Lee *et al.* (2003) sugerem que, devido aos seus efeitos antioxidantes, a astaxantina inibe a produção de mediadores inflamatórios, pelo bloqueio da ativação do fator de transcrição fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Esse mediador é ativado em processos inflamatórios e frequentemente encontrado em importantes doenças cardiovasculares.

Ohgami *et al.* (2003), estudando a capacidade da astaxantina em suprimir o desenvolvimento do processo inflamatório *in vivo*, verificaram que a administração de 100 mg/kg/dia de astaxantina teve uma resposta antiinflamatória semelhante a 10 mg/kg de prednisolona, um corticosteróide com ampla atividade antiinflamatória.

Ainda, o estresse oxidativo pode ser resultante da hiperglicemia, onde pode, possivelmente, causar uma disfunção nas células  $\beta$  pancreáticas e vários danos teciduais em indivíduos diabéticos, inclusive nefropatias. O tratamento com astaxantina preservou a função das células  $\beta$ , responsáveis pela secreção de insulina, e diminuiu consideravelmente os níveis de glicose sanguínea em animais diabéticos (UCHIYAMA *et al.*, 2002). Naito *et al.* (2004) observaram que a astaxantina amenizou a progressão e a aceleração da nefropatia diabética em camundongos db/db, um modelo de roedores para o estudo da diabetes tipo 2. Kim *et al.* (2009), a partir de um estudo com cultura de células, concluíram que a astaxantina foi eficaz na proteção contra muitos efeitos deletérios causados pela elevada concentração de glicose como estresse oxidativo, inflamação e apoptose celular. Os autores propõem que essa xantofila pode ser explorada como um possível fármaco para o tratamento da nefropatia diabética.

A grande quantidade de gorduras insaturadas, ferro e intensa atividade metabólica aeróbica no sistema nervoso central tornam este tecido bastante suscetível aos danos oxidativos. Algumas evidências mostram que como consequência do estresse oxidativo neste tecido, tem-se os riscos de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson, Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica. O

consumo de antioxidantes dietéticos que ultrapassem a barreira hematoencefálica, como é o caso da astaxantina, poderia atenuar o estresse oxidativo no tecido nervoso, reduzindo os riscos de doenças neurodegenerativas (HUSSEIN *et al.*, 2006b). Shen *et al.* (2009) sugerem que a astaxantina pode reduzir os danos teciduais causados pela isquemia cerebral pela inibição do estresse oxidativo, redução na liberação de glutamato e efeitos antiapoptose celular.

A radiação ultravioleta é um significativo fator de risco para o desenvolvimento de doenças de pele, inclusive o câncer. A ação antioxidante da astaxantina pode exercer efeitos fotoprotetores contra alterações celulares provocadas pela exposição aos raios ultravioleta A (UVA) (O'CONNOR & O'BRIEN, 1998). A fotoestabilidade da astaxantina em cultura de células de fibroblastos humanos foi maior que a cantaxantina e que o  $\beta$ -caroteno, indicando que a astaxantina pode exercer um efeito protetor superior contra os danos oxidativos sofridos por essas células (CAMERA *et al.*, 2009). Suganuma *et al.* (2010) encontraram que a astaxantina inibe as espécies reativas de oxigênio produzidas durante a exposição de fibroblastos humanos à radiação UVA, *in vitro*. Os autores sugerem que a astaxantina pode exercer efeitos protetores contra o foto-envelhecimento induzido pela exposição aos raios UVA e suas conseqüências como rugas e flacidez da pele.

As células responsáveis pela resposta imunológica são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo e danos na membrana causados por radicais livres, pois as mesmas dependem das comunicações entre as células e esta comunicação é realizada via receptores localizados em suas membranas celulares. A astaxantina influenciou significativamente a função imune em muitos ensaios *in vitro* e *in vivo* usando modelos animais. Essa xantofila melhorou a produção, *in vitro*, de anticorpos por células do baço de ratos (JYONOUCHI, 1993). Estudos *in vitro* com células sanguíneas humanas têm demonstrado que a astaxantina reforça a produção de imunoglobulinas em resposta ao estímulo de células T (JYONOUCHI, 1995).

### 2.3. Camarão

#### 2.3.1. Panorama mundial e regional da produção e consumo de camarão

O camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) é conhecido popularmente por camarão branco do Pacífico por estar presente naturalmente na costa do Pacífico, principalmente entre o Golfo do México e o norte do Peru (MENZ & BLAKE, 1980). Pertence ao filo

*Arthropoda*, classe *Crustacea*, família *Penaeidae* e gênero *Litopenaeus*. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC), atualmente o *Litopenaeus vannamei* corresponde à principal espécie produzida em cativeiro no Brasil e em vários outros países. Entre janeiro de 2007 e julho de 2009, o camarão foi o principal pescado exportado pelo Brasil (ABCC, 2009), sendo os Estados Unidos, França e Espanha os principais países importadores.

Nos últimos anos, aproximadamente metade do comércio internacional de camarão tem sido derivada da carcinicultura (SAMOCHA *et al.*, 2007). De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o camarão é o mais importante e rentável entre todos os alimentos marinhos comercializados (FAO, 2003). Projeções estimam que o cultivo mundial de camarão continue em expansão na próxima década, principalmente devido aos aperfeiçoamentos nas técnicas de manejo e cultivo desses crustáceos em cativeiro (FAO, 2009).

No Brasil, a partir do final da década de 80, com a introdução do camarão *Litopenaeus vannamei* é que a carcinicultura marinha sofreu um grande impulso (PONTES & ARRUDA, 2005). Em 1996, os camarões cultivados correspondiam a 9% do total dos camarões comercializados no país, sendo que este percentual cresceu para 62% em 2007 (ABCC, 2007). A expansão territorial da carcinicultura brasileira mostra que o setor vem apresentando um expressivo crescimento nos últimos anos. A produção ocidental de camarões cultivados chegou a 271.000 toneladas em 2003, o que correspondeu a 16,63% do total mundial. Neste mesmo ano, o Brasil consolidou a posição de líder do hemisfério em produção de camarões de cultivo, superando o Equador e México que, tradicionalmente, ocupavam o primeiro e segundo lugar, respectivamente (ROCHA *et al.*, 2004). No ano de 2005, a produção mundial atingiu cerca de 2,36 milhões de toneladas onde o Brasil contribuiu com cerca de 65 mil toneladas em 15 mil hectares de cultivo (RIECHE & MARTINS, 2006).

No estado de Santa Catarina, o cultivo de camarões teve início em 1984. Neste ano, a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) iniciou suas pesquisas de reprodução e cultivo de camarão-rosa, uma espécie nativa. No entanto, os resultados obtidos foram insatisfatórios e os empreendimentos enfraquecendo (PASSOS, 2007). No ano de 1998 a UFSC e a Epagri introduziram no estado a espécie *Litopenaeus vannamei*, uma vez que o cultivo deste havia apresentado bons resultados nos cultivos realizados no Nordeste do país (PASSOS, 2007).

De acordo com o último censo da carcinicultura nacional realizado pela ABCC em 2004, o estado de Santa Catarina é o quinto maior produtor de camarões cultivados, atrás somente dos estados do Rio Grande do Norte, Bahia, Ceará e Pernambuco (ABCC, 2004). Dados da Secretaria Especial da Aquicultura e Pesca (SEAP, 2005) revelam que, em 2005, Santa Catarina foi responsável pela produção de 2.726,5 toneladas de camarões de cultivo, consolidando a posição de um dos maiores produtores de camarão do Brasil. A projeção para a carcinicultura catarinense, bem como para os demais estados produtores, é de que ocorra um aumento na produção, nos próximos anos, devido ao aumento da demanda dos mercados interno e externo.

### 2.3.2. Forma de obtenção de astaxantina por camarões e suas funções

Uma variedade de pigmentos carotenóidicos é encontrada nos camarões. No entanto, a astaxantina é o carotenóide majoritário encontrado nesses crustáceos (TORRISSSEN *et al.*, 1989; ARMENTA & GUERRERO-LEGARRETA, 2009).

Os camarões, quando em seu habitat natural, obtêm astaxantina a partir da ingestão de microalgas, principalmente a alga *Haematococcus pluvialis*, a qual é considerada uma das principais fontes de astaxantina (JOHNSON & AN, 1991). No entanto, em cativeiro, é necessária a adição de fontes de carotenóides para que os camarões os convertam em astaxantina, ou adicionar essa xantofila diretamente à ração dos crustáceos. Desta maneira, o carotenóide será absorvido e depositado na carne e exoesqueleto conferindo a coloração característica desses crustáceos.

Esse carotenóide exerce uma importante função na aquicultura. A presença de pigmentos carotenóides na dieta influencia na coloração dos pescados, favorecendo a aceitabilidade dos mesmos quando criados fora de seu ambiente natural (MORIEL *et al.*, 2005). Ainda, entre os alimentos de origem animal, os pescados, inclusive os camarões, estão entre os mais propensos à deterioração oxidativa devido à alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados e aos níveis relativamente elevados de colesterol (JOHNSTON *et al.*, 1983). No entanto, a astaxantina presente nos camarões pode agir protegendo-os contra os danos oxidativos (PALOZZA *et al.*, 2008).

A expansão do cultivo de camarão em cativeiro tem levado a busca pelo conhecimento sobre o requerimento dietético desses crustáceos nessas condições, bem como o desenvolvimento de rações de alta qualidade nutricional e com baixo custo (GONG *et al.*, 2001), uma

vez que a alimentação é um dos fatores responsáveis pelo custo elevado da produção comercial de camarão.

A ração balanceada é um complemento nutricional cujo manejo e aplicação determina a viabilidade do cultivo. A ração é ofertada através de comedouros (bandejas) e sua quantidade se baseia em tabelas para calcular a oferta diária, sendo esta reajustada em função das sobras alimentares (ALMEIDA NETO & FREIRE, 2007).

A alimentação é o principal aspecto para o crescimento e sobrevivência dos camarões cultivados. Lipídeos são um importante nutriente para crustáceos, pois são fontes de energia e ácidos graxos essenciais (ZHOU *et al.*, 2007). No entanto, uma melhora na resistência dos organismos aquáticos para o estresse físico tem sido observada com a suplementação dietética de astaxantina devido a sua propriedade antioxidante (CHIEN *et al.*, 2003). Miki (1991) observou que a atividade antioxidante da astaxantina é aproximadamente dez vezes maior do que os demais pigmentos carotenóides. Segundo Flores *et al.* (2007), a suplementação com 80 mg de astaxantina/kg de ração é recomendada para que se obtenham bons resultados quanto à coloração e para aumentar a sobrevivência, evitando, desta forma, perdas de camarões criados em cativeiro.

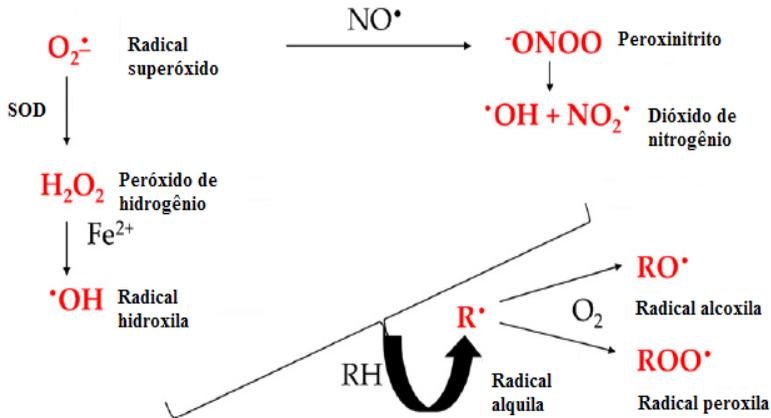
A astaxantina é um dos mais caros ingredientes utilizados na alimentação de camarões cultivados. Nos últimos anos, a carcinicultura vem ganhando destaque no mercado nacional e internacional. Desse modo, com o intuito de aumentar o valor do produto não apenas em aspectos econômicos, mas também nutricionais, pesquisas enfocando a adição de pigmentos naturais às rações de camarões têm sido feitas buscando alternativas para a diminuição dos custos da produção sem alterar a qualidade do produto final (PASSOS, 2007).

As funções que a astaxantina desempenha em seres aquáticos estão bem definidas na literatura. Porém, em seres humanos, quando este carotenóide é obtido através da dieta, ainda são poucos e inconclusivos os estudos sobre o papel que o mesmo poderá exercer na prevenção e/ou tratamento de algumas doenças.

## **2.4. Agentes oxidantes, estresse oxidativo, peroxidação lipídica e antioxidantes**

### **2.4.1. Agentes Oxidantes: radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio**

Os radicais livres podem ser classificados como moléculas orgânicas e inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, sendo capazes de existir independentemente de outras substâncias (HALLIWELL, 1994a). A configuração química dessas moléculas faz com que sejam altamente instáveis com meia-vida curta e quimicamente muito reativas (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Esses compostos são formados a partir de processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, como parte de seu metabolismo normal (HALLIWELL, 1994b; POULSON *et al.*, 1998). Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular, sendo que o alvo celular desses radicais (proteínas, lipídeos, carboidratos ou DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997). Conforme mostrado na figura 4, os radicais livres mais comuns são o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) (BARTOSZ, 2008). Outras moléculas como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) não são radicais; porém, são mencionados como possíveis geradores de radicais em algumas reações químicas (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001).



**Figura 4:** Principais espécies radicais geradas *in vivo* (adaptado de BARTOSZ, 2009).

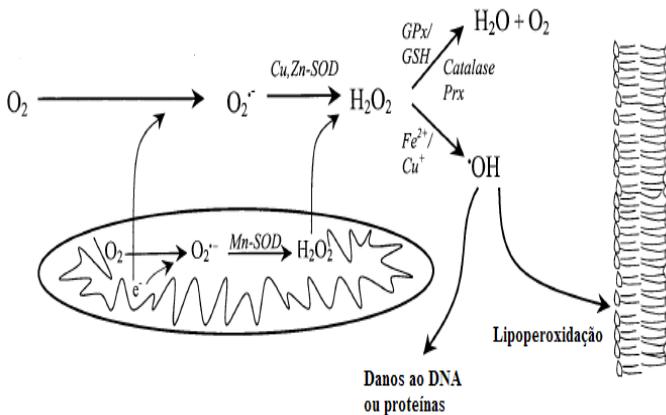
Espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são termos que abrangem todas as formas reativas do oxigênio e do nitrogênio, incluindo radicais e não radicais, que

participam de reações em cadeia as quais envolvem a formação de espécies radicalares (CERQUEIRA *et al.*, 2007). As ERO englobam um grande número de moléculas derivadas do oxigênio e quimicamente muito reativas. São formadas e degradadas por organismos aeróbicos, sendo sua formação requerida para o normal funcionamento celular (NORDBERG & ARNER, 2001). Constatase que cerca de 1-2% do oxigênio consumido durante a respiração normal seja reduzido a radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) (OTT *et al.*, 2007). Os radicais de oxigênio, em concentrações adequadas, estão envolvidos em várias atividades biológicas como a transdução de sinais, a transcrição de genes e a regulação da atividade de algumas enzimas (VALKO *et al.*, 2006; UTTATA *et al.*, 2009). Alguns exemplos para a formação dessas espécies são: a formação de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) por células responsáveis pela defesa imunológica e a partir do oxigênio molecular ( $O_2$ ) através da respiração mitocondrial, e a formação de óxido nítrico como parte do mecanismo de vasodilatação (MADAMANCHI *et al.*, 2005). Ainda, podem ser considerados como espécies reativas, o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o ozônio ( $O_3$ ), as quais podem induzir reações radicalares no organismo (PATEL *et al.*, 1999). Nas ERN estão incluídos o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o radical dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\bullet}$ ).

Segundo Uttara *et al.* (2009), podem-se citar como algumas das principais fontes endógenas de agentes oxidantes, as seguintes reações celulares: 1) respiração aeróbica normal na qual a mitocôndria consome  $O_2$  produzindo sequencialmente  $O_2$ ,  $H_2O_2$  e  $-OH$  como bioprodutos, 2) células infectadas por vírus e bactérias, destruídas por fagocitose e que liberam, durante esse processo, agentes oxidantes como  $NO^{\bullet}$ ,  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , 3) peroxissomas produzem  $H_2O_2$  como um bioproduto da degradação de ácidos graxos e outros lipídios moleculares, os quais são posteriormente degradados pela enzima catalase.

Ainda, são considerados fatores endógenos os sistemas enzimáticos regulatórios, como o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH-oxidase) e as enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que produzem as ERO/ERN durante o processo de transferência de elétrons, o qual ocorre em decorrência do metabolismo celular (PASHKOW *et al.*, 2008), inflamações e enzimas do citocromo P450 (BIANCHI & ANTUNES, 1999; UTTARA *et al.*, 2009). Medicamentos, radiações ultravioleta, dieta, poluição, fumo e estresse são alguns dos fatores exógenos aos quais o organismo pode estar exposto e que são responsáveis pela geração de ERO/ERN (UTTARA *et al.*, 2009).

Conforme o exposto, os radicais livres podem desempenhar um importante papel na origem e manutenção da vida (FANG *et al.*, 2002). No entanto, em excesso esses compostos são danosos ao organismo (figura 5) devido a sua alta reatividade, uma vez que reagem com componentes celulares causando danos oxidativos através de uma cadeia de reações (DI MASCIO *et al.*, 1991). Essas reações de oxidação são um dos fatores responsáveis pelo surgimento de doenças degenerativas e envelhecimento (BRAND *et al.*, 2004; VALKO *et al.*, 2006; ZIELONKA & KALYANARAMAN, 2008; GRISHKO *et al.*, 2009).



**Figura 5:** Esquema simplificado do sistema oxidante nas células (adaptado de NORDBERG & ARNÉR, 2001).

#### 2.4.2. Estresse Oxidativo: definição e possíveis efeitos no organismo

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre fatores oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes, prejudicando a integridade celular (SIES, 2000). Agentes oxidantes em excesso são danosos ao organismo, pois, como anteriormente mencionado, podem reagir com biomoléculas (DI MASCIO *et al.*, 1991; PASHKOW *et al.*, 2008), como proteínas (STADTMAN & LEVINE, 2000), lipídeos e lipoproteínas (AMES *et al.*, 1993) e ácido desoxirribonucléico (DNA) (AMES *et al.*, 1993).

Quando produzidas em quantidades excessivas, espécies reativas de oxigênio causam prejuízo em várias funções metabólicas. Um exemplo é quando o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) oxida o centro 4Fe-4S de

enzimas desidratases, como a aconitase, a qual libera Fe(II). O Fe(II) reage com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para formar o radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), um potente radical livre oxidado. Estes radicais livres é que reagirão com substratos orgânicos chaves, causando distúrbios celulares e morte celular (UTTARA *et al.*, 2009).

O óxido nítrico (NO) produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) nas células musculares lisas vasculares, acredita-se ser o principal fator responsável pela integridade endotelial dos vasos. O NO é um importante sinalizador molecular que essencialmente regula o vasorelaxamento, a proliferação de células espumosas, adesão de leucócitos, agregação plaquetária e tônus vascular (ZHENG & STORZ, 2000). A deficiência na produção do NO causa a chamada “disfunção endotelial”, que pode ser definida como o impedimento das funções endoteliais mais importantes, como as propriedades vasorelaxantes, anticoagulantes e antiinflamatórias (RUSSE & FLEMING, 1996). Essa perda da função endotelial pode ser uma das causas da formação da placa ateromatosa (PASHKOW *et al.*, 2008). No entanto, quando, em virtude de alguma desordem bioquímica ou estresse oxidativo, ocorrer um acréscimo na produção de NO, este por ser um radical livre gasoso, poderá reagir com várias moléculas biológicas (KANNER *et al.*, 1991). Sua reação com o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) produz peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é extremamente tóxico e pode se decompor e formar o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2^\cdot$ ) (PALMER, 1995), os quais reagem com biomoléculas causando danos oxidativos. O excesso vascular na produção de  $O_2^{\cdot-}$  pode contribuir para a hipertensão e vasoespasmo (HUIE & PADMAJA, 1993). Consequentemente, o estresse oxidativo pode representar um mecanismo chave na progressão de doenças cardiovasculares e uma possibilidade para a intervenção clínica (SCHULZ *et al.*, 2004).

O fator de transcrição nuclear kapaB (NF- $\kappa$ B) tem sido relacionado com o desencadeamento do processo inflamatório, sendo assim, merecedor de maiores atenções para intervenções medicinais. Quando ativado pelo estresse oxidativo, patógenos ou outros agentes fisiológicos, o NF- $\kappa$ B é capaz de ativar genes pró-inflamatórios (TAK & FIRESTEIN, 2001). O NF- $\kappa$ B parece ser ativado em sítos de inflamação de diversas doenças, destacando-se as doenças cardiovasculares e lesões ateroscleróticas (LI & VERMA, 2002). Níveis aumentados de lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) ativam o NF- $\kappa$ B, sugerindo uma ligação entre o estresse oxidativo e a inflamação através desta via (COMINACINI *et al.*, 2005).

A composição bioquímica do tecido neuronal e a grande quantidade de lipídios fazem com que este tecido seja bastante suscetível à peroxidação e modificação oxidativa (UTTARA *et al.*, 2009). O estresse oxidativo tem sido citado como um dos fatores para o aparecimento de doenças neuronais como isquemia cerebral, doença de Parkinson e Alzheimer (RICHARDSON *et al.*, 1990; TORBATI *et al.*, 1992; YOSHIKAWA, 1993; YOUDIM & LAVIE, 1994). As duplas ligações dos ácidos graxos insaturados são os locais de ataque para os radicais livres iniciarem uma cadeia de reações que levam a oxidação do tecido (BUTTERFIELD *et al.*, 2002). No sistema nervoso, as células gliais necessitam de mais oxigênio e glicose para gerar um *pool* de ATP *in vivo* e, desta maneira, garantir o funcionamento normal desse sistema. O consumo de oxigênio por estas células as torna mais suscetíveis a geração de radicais livres no tecido nervoso (LEPROIVE *et al.*, 1994). Em condições normais, 1-2% do O<sub>2</sub> consumido é convertido a ERO, mas com o envelhecimento essa porcentagem pode aumentar devido à reduzida quantidade de antioxidantes e baixa capacidade de regeneração do tecido cerebral (LEPROIVE *et al.*, 1994).

Conforme o exposto, os danos oxidativos causados pelo ataque de radicais livres em biomoléculas têm sido relacionados com a etiologia de doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, aterosclerose, artrite reumatóide, inflamação crônica, hipertensão, degeneração macular, Parkinson e Alzheimer (YUN-ZHONG *et al.*, 2002). Sendo assim, as ações dos compostos antioxidantes endógenos e/ou exógenos são necessárias com o intuito de controlar e reduzir os possíveis danos causados pelo estresse oxidativo no organismo.

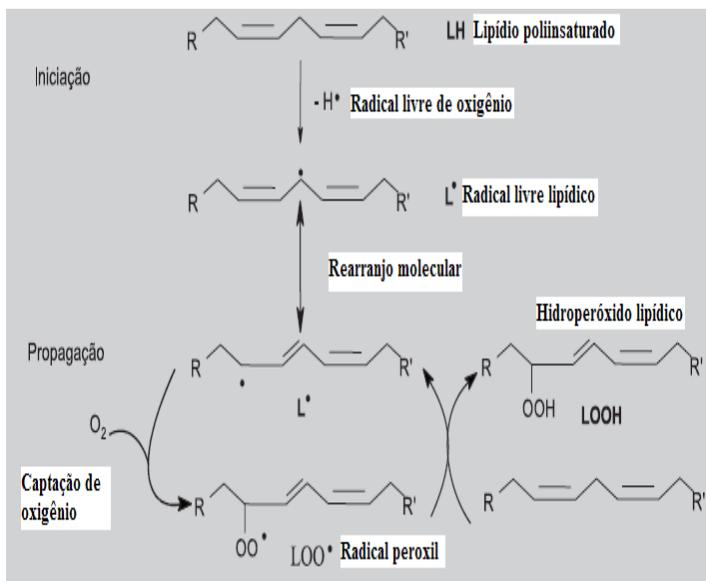
#### 2.4.3. Peroxidação lipídica

Na década de 1930, a peroxidação lipídica começou a ser estudada em relação à deterioração de alimentos quando estudos envolvendo a química das reações iniciadas por radicais livres tiveram um marcante avanço (NIKI, 2000). Com o aumento da evidência mostrando o envolvimento dos radicais livres na biologia, a peroxidação lipídica tem recebido atenção sob muitos aspectos nos campos da bioquímica, nutrição e medicina (NIKI, 2009).

Pode-se definir a lipoperoxidação como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e morte celular (HALLIWELL, 1987; BENZIE, 1996). Nos sistemas biológicos

a lipoperoxidação pode ocorrer principalmente por duas vias: 1) uma via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e 2) a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de ERO e ERN, metais de transição e outros radicais livres (PORTER, 1986; PORTER *et al.*, 1995; NIKI *et al.*, 2005).

O processo de lipoperoxidação não enzimática está dividido em três fases: iniciação, propagação, conforme mostra a figura 6, e terminação ou degradação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, na qual o ácido graxo poliinsaturado sofre o ataque de uma espécie que é suficientemente reativa, como o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), para abstrair um átomo de hidrogênio (H) de um grupo metileno ( $-\text{CH}_2-$ ), formando um radical centrado em carbono ( $-\text{CH}^\bullet-$ ). Este radical sofre um rearranjo molecular formando um produto mais estável, o dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Em meio aeróbico, o radical inicialmente formado combina-se com o oxigênio formando o radical peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), o qual pode abstrair átomos de hidrogênio de moléculas lipídicas, gerando novos radicais peroxila e lipoperóxidos promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um acúmulo de hidroperóxidos lipídicos ( $\text{ROOH}$ ), que podem destruir a estrutura e função da membrana (WELCH *et al.*, 2002). O processo de terminação consiste na aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



**Figura 6:** Reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica (adaptado de LIMA & ABDALLA, 2001).

Íons de metais de transição, como o ferro (Fe) e o cobre (Cu), são bastante reativos em reações de óxido-redução. Podem participar do processo catalisando a formação de radicais alcóxila ( $RO^{\bullet}$ ), pela quebra da ligação O-O, e peróxila, pela abstração de um hidrogênio. Superóxido e óxido nítrico são produzidos por enzimas como NADPH oxidase, xantina oxidase e NOS. Nenhum desses produtos tem a capacidade de iniciar sozinhos a peroxidação lipídica, mas eles reagem formando peroxinitritos, os quais podem iniciar a cadeia de reações para a peroxidação lipídica (PACHER *et al.*, 2007). A terceira e última fase da reação, a fase de degradação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares. Epóxidos, compostos carbonílicos, gases hidrocarbonetos, aldeídos como o malonaldeído (MDA) e 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal também são produtos da decomposição dos lipoperóxidos por metais (GARDNER, 1989; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Essas reações em cadeia antecedem a oxidação de membranas biológicas (YAMAMOTO *et al.*, 1986) e lipoproteína de baixa densidade (NOGUCHI *et al.*, 1993) *in vitro*.

A peroxidação lipídica também é favorecida pela síntese enzimática de lipoperóxidos pelas enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases. Peróxidos e hidroperóxidos reagem com o ferro contido no sítio catalítico das peroxidases gerando um composto intermediário, o qual oxida um doador de hidrogênio, por exemplo, o NADPH. O segundo composto formado pode oxidar o substrato e regenerar a enzima (CHANGE *et al.*, 1979). Desta maneira, a lipoperoxidação pode ocorrer durante o processo de fagocitose pelos neutrófilos e monócitos, que contém uma heme proteína, a mieloperoxidase (LIMA & ABDALLA, 2001). O sistema mieloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/haletos gera espécies reativas como O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, HOCl e NO<sup>•</sup>, que podem abstrair um hidrogênio alílico, iniciando a lipoperoxidação (CARR *et al.*, 2000). As enzimas lipoxigenases estão presentes no citosol das células e catalisam a inserção do oxigênio nos ácidos graxos poliinsaturados, produzindo um hidroperóxido lipídico. Essas enzimas têm maior capacidade de reagir com ácidos graxos dioxigenados como, por exemplo, os ácidos linoléico e araquidônico (HSIEH & KINSELLA, 1989). As enzimas ciclooxigenases, por sua vez, catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, que é um endoperóxido cíclico, através de uma série de reações nas quais o oxigênio é inserido à molécula do ácido graxo poliinsaturado, seguindo-se a ativação do ácido graxo via abstração do hidrogênio. As ciclooxigenases, em condições fisiológicas, são as maiores produtoras de peróxidos lipídicos (HSIEH & KINSELLA, 1989).

Apesar de alguns estudos relatarem possíveis efeitos benéficos dos produtos da lipoperoxidação em baixas concentrações (CEASER *et al.*, 2004; ZMIJEWSKI *et al.*, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2006), tem sido demonstrado que a peroxidação lipídica induz distúrbios de finas estruturas celulares, alteração da integridade, fluidicidade e permeabilidade, perda funcional de membranas e modificações em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) para formas pró-aterogênicas e pró-inflamatórias (GREENBERG *et al.*, 2008). Produtos da lipoperoxidação, como os compostos carbonilados, têm sido citados como mutagênicos e carcinogênicos (UCHIDA, 2003; WEST & MARNETT, 2006) e indutores de morte celular (PIGA *et al.*, 2007). Recentemente, os níveis desses produtos em fluidos biológicos e tecidos têm sido estudados extensivamente como potenciais biomarcadores do estresse oxidativo *in vivo* (DALLE-DONNE *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008; YOSHIDA *et al.*, 2008). Muitos estudos mostram a associação existente entre o aumento do estresse oxidativo e a peroxidação lipídica e o surgimento de doenças crônicas (DALLE-DONNE *et al.*, 2006;

BASU, 2008; LEE *et al.*, 2009). Portanto, a lipoperoxidação *in vivo* pode ser relacionada como mecanismo subjacente no processo de envelhecimento e no desenvolvimento de diversas doenças crônicas.

#### 2.4.4. Antioxidantes

Antioxidantes são moléculas que têm a habilidade de remover radicais livres de um sistema, seja freando a reação de oxidação, ou pela reação com os agentes oxidantes, produzindo compostos inócuos (BRITTON, 1995). Os antioxidantes inibem os danos oxidativos diretamente pelo seqüestro ou pela ativação de espécies seqüestradoras de oxigênio (NIKI, 2009). De maneira geral, podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e antioxidantes não-enzimáticos (SIES, 1993; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001), sendo ambos de grande importância para a defesa do organismo frente aos danos causados pelo estresse oxidativo (BLOCK *et al.*, 2002). Os antioxidantes enzimáticos, também conhecidos como antioxidantes endógenos, são enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reduzida (GSH) (YUN-ZHONG *et al.*, 2002; HIGUERA-CIAPARA *et al.*, 2006), as quais apresentam a capacidade de remover espécies reativas de oxigênio, ou seja, bloqueiam a iniciação da oxidação. Os antioxidantes não-enzimáticos são moléculas que reagem com os radicais e são consumidas durante a reação de oxidação. Como exemplos dessa classe de antioxidantes, podem-se citar o NADPH e NADH, a ubiquinona (Coenzima Q10), proteínas ligadoras de metais (metalotioneínas, transferrina, albumina e mioglobina). Ainda neste grupo, incluem-se os antioxidantes exógenos, ou seja, compostos naturais provenientes da dieta, tais como os flavonóides e compostos fenólicos, vitaminas e carotenóides (LASHERAS *et al.*, 2003; UTTARA *et al.*, 2009).

As células tentam manter baixas as quantidades de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio através da ação das enzimas antioxidantes, desta maneira, evitando a formação do radical hidroxil, altamente reativo e deletério às células (BOVERIS & CADENAS, 1997). Embora as defesas antioxidantes endógenas sejam efetivas, ocorre constantemente a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), que interagem em diferentes compartimentos celulares antes de serem eliminadas. Sendo assim, as ações dos antioxidantes obtidos através da dieta somam-se às dos antioxidantes endógenos formando uma defesa apropriada contra as

reações de oxidação e, portanto, realizando um importante papel na manutenção da saúde.

Em alguns casos, o aumento do estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento e progressão de doenças crônicas e suas complicações, as quais são usualmente acompanhadas pelo aumento da produção de radicais livres ou falha na defesa antioxidante (HALIWELL & GUTTERIDGE, 1990; YOUNG *et al.*, 1995; CERIELLO, 2000). Estudos epidemiológicos demonstram que compostos antioxidantes possuem atividade antiinflamatória, antiaterosclerótica, antitumoral, antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana e antiviral e neuroproteção (HIRVONEN *et al.*, 2000; OWEN *et al.*, 2000; SALA *et al.*, 2002; SHEN *et al.*, 2009; FERRETTI *et al.*, 2010).

As ações dos antioxidantes endógenos, bem como o consumo de antioxidantes naturais, previnem a geração de radicais livres, a oxidação de proteínas e a peroxidação lipídica, formando uma barreira natural contra os possíveis danos causados pelo estresse oxidativo no organismo. Estudos têm mostrado que a oxidação de biomoléculas pode ser inibida pelo consumo de quantidades apropriadas de compostos antioxidantes a partir de uma dieta diária equilibrada (BOSE & AGRAWAL, 2007; THOMSON *et al.*, 2007; TAKEDA *et al.*, 2008).

#### 2.4.5. Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Há uma grande diversidade de métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante de substâncias, seja *in vitro* ou *in vivo* (TSAO & DENG, 2004). Nos alimentos, essas substâncias agem no sentido de proteger os mesmos da oxidação, que está relacionada com a deterioração, como no caso de óleos e gorduras, e com a perda do valor nutricional. No entanto, sabe-se que as substâncias ditas antioxidantes podem também prevenir a oxidação de estruturas biológicas (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Não existe um sistema ideal capaz de quantificar a atividade antioxidante de uma amostra. O tipo de solvente, a polaridade do mesmo e da amostra e a presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas podem alterar os resultados (PÉREZ-JIMENEZ & SAURACALIXTO, 2006). Soma-se a isso que o potencial antioxidante *in vitro* não indica necessariamente a sua capacidade antioxidante *in vivo*. Portanto, tanto os métodos *in vitro* como os métodos *in vivo* que têm sido utilizados na avaliação da atividade antioxidante possuem suas limitações e vantagens. Alguns métodos podem ser utilizados com

extratos hidrossolúveis enquanto outros são mais apropriados para compostos lipossolúveis (KAUR & KAPOOR, 2001).

Atualmente, a maioria dos métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante *in vitro* tem como princípio a formação de radicais livres, os quais são capturados pela substância antioxidante em estudo. No entanto, levando em consideração que não existe um processo metodológico universal, impõe-se a necessidade de avaliar a capacidade antioxidante por diferentes ensaios, com mecanismos de ação diferentes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho consistiu em avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides totais extraídos do músculo de camarões *Litopenaeus vannamei*, utilizando diferentes ensaios com diferentes mecanismos de ação.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides totais extraídos do músculo de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados, durante 30 dias, em cativeiro, utilizando as seguintes análises:

1) análise da proteção contra a peroxidação lipídica no soro e no homogenato de fígado de ratos, bem como a capacidade dos carotenóides totais em proteger a molécula de um lipídio poliinsaturado (ácido linoléico) contra reações de oxidação;

2) análise da capacidade de seqüestro de um radical livre (DPPH) por parte dos carotenóides totais.

- Quantificar a astaxantina obtida através da extração dos carotenóides do músculo dos camarões;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Materiais e Reagentes

As substâncias relacionadas a seguir foram adquiridas da Sigma (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): astaxantina; radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); ácido tiobarbitúrico (TBA); malondialdeído (MDA); colesterol; ácido linoléico e  $\beta$ -caroteno. 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloro (AAPH) foi adquirido da Wako Chemicals Co. (Tóquio, Japão). Os demais reagentes utilizados, todos de qualidade analítica, foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água destilada ou deionizada.

A astaxantina utilizada para o preparo das rações dos camarões foi proveniente da biomassa microalgal seca da espécie *Haematococcus pluvialis* ALGAMAC AST (Aquafauna Bio-Marine, INC).

### 4.2. Cultivo dos camarões *Litopenaeus vannamei*

Os experimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. As amostras foram produzidas em conjunto com os experimentos da tese da doutoranda Jane Parisenti do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos (PARISENTI, 2009), conforme delineamento descrito abaixo.

Os camarões foram cultivados em dois grupos experimentais, os quais recebiam uma ração diferenciada, conforme esquema abaixo:

**Camarão grupo controle (CC):** recebeu ração controle, sem adição de carotenóides, porém, os 3 ppm de carotenóides presentes eram provenientes dos componentes da dieta;

**Camarão grupo suplementado (CS):** recebeu ração suplementada com 60 ppm de carotenóides provenientes da alga *Haematococcus pluvialis*.

Foram utilizados 480 camarões brancos do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) com aproximadamente 10 g cada. Os camarões foram distribuídos em 6 tanques (2 tratamentos, com 3 repetições) com 80 camarões cada. Os camarões foram alimentados por 30 dias, com 3% de ração em relação ao peso corporal, 3 vezes ao dia, em quantidades iguais.

Os parâmetros de qualidade da água (oxigênio, amônia, nitrito e nitrato) foram monitorados semanalmente. Antes do início do

experimento, os animais foram alimentados por 5 dias com ração comercial Potimar 35 EXT (Guabi®) isenta de carotenóides para a aclimatação.

#### 4.2.1. Preparo das rações

A ração controle foi elaborada com base nos trabalhos de Arredondo-Figueroa *et al.* (2003) e Boonyaratpalin *et al.* (2001). A partir desta, foi preparada a ração com suplementação de astaxantina, conforme descrito na tabela 1. A quantidade de astaxantina adicionada à ração foi determinada com base nos trabalhos de Yamada *et al.* (1990), Chien & Jeng (1992), Boonyaratpalin *et al.* (2001), Arredondo-Figueroa *et al.* (2003) e Supamattaya *et al.* (2005).

**Tabela 1 – Composição das rações controle e suplementada**

<b>Ingredientes (g/kg)</b>	<b>Controle</b>	<b>Suplementada (astaxantina)</b>
Farinha de peixe	360	360
Proteína de soja	120	120
Farelo de trigo	250	250
Farinha de trigo	190	190
Pré-mix vitamínico/mineral	20	20
Óleo de fígado de bacalhau	25	25
Colesterol (Sigma)	0,5	0,5
Óleo de soja	20	20
<i>H. pluvialis</i> (biomassa seca)	-----	5

As rações foram elaboradas no Laboratório de Nutrição do Departamento de Aquicultura no Centro de Ciências Agrárias, UFSC. Os ingredientes secos foram misturados manualmente. Em seguida foi adicionado o óleo de fígado de bacalhau e o óleo de soja previamente homogeneizados com a biomassa de *H. pluvialis* e por último adicionada água até a consistência para passar na peletizadora. Os peletes foram feitos como espaguete com 1,5 mm de diâmetro e cortados em pedaços de até 1 cm. A ração foi seca em estufa a 45 °C, por 14 h e acondicionada em sacos plásticos, vedados e congelados até o uso.

### **4.3. Extração dos carotenóides totais do músculo dos camarões cultivados**

Após 30 dias de tratamento com as diferentes rações, foi realizada a coleta dos camarões *Litopenaeus vannamei* e separados o músculo e o exoesqueleto dos mesmos. Para o presente estudo foi utilizada somente a fração carotenóidica extraída do músculo desses crustáceos, uma vez que esta é a parte mais consumida na dieta humana e, conseqüentemente, de maior interesse nutricional. Posteriormente, realizou-se a extração dos carotenóides totais do músculo utilizando o método proposto por Tolasa *et al.* (2005). As amostras de músculo foram pesadas e trituradas em um multiprocessador. Depois, a 5 g da amostra triturada foram adicionados 30 mL de acetona e a mistura então foi homogeneizada em homogeneizador mecânico. Esse processo foi repetido três vezes consecutivas para a completa extração dos carotenóides. Os extratos foram reunidos em um funil de separação no qual foi adicionado 100 mL de água destilada, 0,5 g de NaCl e 40 mL de hexano para a separação dos compostos solúveis em água. A mistura foi mantida no escuro durante 20 min. Para eliminar as impurezas da solução, após os 20 min de repouso, o extrato em hexano foi filtrado em sulfato de sódio anidro em balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com solvente hexano.

### **4.4. Quantificação dos carotenóides totais**

Após a extração, a concentração de carotenóides totais das amostras foi obtida a partir da leitura da absorbância do extrato hexânico a 470 nm em espectrofotômetro (Shimadzu LC-10). Os valores obtidos eram lançados em uma curva padrão de astaxantina (Sigma, 98%), previamente elaborada ( $y=0,1847x + 0,0103$ ,  $R^2=0,9951$ ). As análises foram realizadas em triplicata.

Após os procedimentos acima descritos, para evitar uma possível oxidação da amostra devido ao contato com o oxigênio do ar, foi injetado gás nitrogênio nos frascos contendo as amostras. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar, em freezer à temperatura de -12 °C até o momento das análises de quantificação da astaxantina e capacidade antioxidante dos carotenóides totais.

#### 4.5. Quantificação da astaxantina no extrato carotenóidico

A análise quantitativa da astaxantina no extrato hexânico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. Para tal, foram injetadas 10  $\mu$ L do extrato em cromatógrafo líquido Shimadzu SP 10A, equipado com coluna C18 de fase reversa (Vydac 201TP54, 250mm x 4.6mm – BioRad) e detector UV/Vis (Shimadzu SPD 10A),  $\lambda=477$ nm. A fase móvel utilizada consistia de uma solução de metanol:acetonitrila (90:10, v/v), em fluxo de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 13 min e a quantificação da astaxantina realizada em comparação com o tempo de retenção da astaxantina padrão (4 a 4,2 min). O teor de astaxantina foi calculado com base em uma curva padrão ( $y = 44231,56364 x$ ,  $R^2 = 0,99024$ ) de astaxantina (Sigma, 98%), sendo considerada a média de 3 injeções sequenciais por amostra.

#### 4.6. Preparo das soluções para as análises da capacidade antioxidante

Após a extração dos carotenóides totais do músculo dos camarões e a quantificação dos mesmos e da astaxantina, um volume previamente calculado do extrato hexânico foi transferido para um frasco âmbar e o solvente evaporado com gás nitrogênio.

Os volumes foram calculados para que se obtivesse, após a evaporação do hexano e adição do solvente utilizado em cada análise, uma solução estoque concentrada de carotenóides totais. A partir dessa solução, foram feitas diluições para as concentrações finais desejadas em cada análise da capacidade antioxidante.

Para a análise da proteção contra a peroxidação lipídica no soro e homogenato de fígado foi preparada uma solução estoque de 25  $\mu$ M, em metanol, do extrato carotenóidico dos camarões e da astaxantina sintética. A partir dessa solução, foram feitas diluições para as concentrações finais de 0,25; 1,25; 2,5 e 5  $\mu$ M.

Para a análise da capacidade de sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), após a evaporação do solvente com gás nitrogênio, os carotenóides totais aderidos ao frasco foram resuspenso em hexano:tetrahidrofurano (3:1, v/v), em volumes previamente calculados para se obter soluções nas concentrações de 5 ou 10  $\mu$ M.

Para a determinação da atividade antioxidante a partir do sistema da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, após a evaporação do

solvente com gás nitrogênio, os carotenóides totais aderidos ao frasco foram resuspensos em hexano, em volumes previamente calculados para se obter soluções nas concentrações de 10 ou 20  $\mu\text{M}$ .

Partindo-se do princípio de que a astaxantina é o carotenóide majoritário encontrado nos camarões, optou-se por fazer a comparação da atividade antioxidante do extrato carotenóidico extraído do músculo dos camarões com a astaxantina sintética (Sigma, 98%) sendo que esta foi preparada conforme descrito acima.

#### **4.7. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos carotenóides totais**

##### 4.7.1. Análise de proteção contra a peroxidação lipídica *in vitro*

###### 4.7.1.1. Preparação do soro e homogenato de fígado

Para os ensaios de peroxidação lipídica *in vitro*, foram utilizados tecidos extraídos de ratos albinos Wistar, machos, pesando entre 200 e 300 g, com idade entre 8 e 9 semanas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alojados em gaiolas plásticas individuais, mantidos em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta comercial e água *ad libitum*.

No dia das análises, os animais foram previamente anestesiados com mistura de quetamina (Francotar<sup>®</sup>) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum<sup>®</sup>) e, seguidamente realizada a coleta de sangue através de punção cardíaca. Um *pool* de sangue coletado de vários animais foi colocado em tubo de ensaio e submetido à centrifugação a 3000 rpm durante 15 min para a obtenção do soro. Após, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, coletado o fígado. Após a coleta, o órgão foi lavado com solução salina refrigerada, seco e pesado. O homogenato desse tecido foi preparado conforme descrito por Mosimann *et al.* (2006). Foi pesado aproximadamente 500 mg de tecido e homogeneizado (1:9 p/v) em 20 mmol/L de tampão fosfato (pH 7,4) contendo 0,1% de Triton e 150 mmol/L de NaCl. O homogenato foi centrifugado a 3000 x g por 15 min e o sobrenadante foi utilizado para as medidas de TBARS.

O soro e o homogenato foram armazenados em caixas refrigeradas e transportados imediatamente ao Laboratório de Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose, Departamento de Análises Clínicas, CCS – UFSC, onde foram realizadas as análises de TBARS.

A concentração tecidual de proteínas foi determinada usando o ensaio de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

Os procedimentos previamente descritos foram realizados de acordo com as normas éticas de cuidados com animais de laboratório. O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e está cadastrado sob o número 23080.008792/2009-60.

#### 4.7.1.2. Indução da peroxidação lipídica no soro e homogenato de fígado

A indução da oxidação nos tecidos foi feita utilizando dois diferentes agentes oxidantes: cloreto de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ), concentração final 0,1 mM, adaptado de Kamada *et al.* (2005), e 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), concentração final 5 mM, adaptado de Silva *et al.* (1998) (tabelas 2 e 3).

O íon cobre (Cu) é bastante ativo em reações de óxido-redução. Essas reações podem liberar um potente agente oxidante, o radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O  $\text{OH}^\bullet$  retira um átomo de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, iniciando o processo de peroxidação lipídica (GALHARDI *et al.*, 2004) e resultando em um acúmulo de hidroperóxidos. O AAPH é um conhecido gerador de radical peroxil a partir de ácidos graxos insaturados (SOLARSKA *et al.*, 2010).

As soluções dos agentes oxidantes foram preparadas em concentrações mais elevadas para que, posteriormente, fossem realizadas as diluições até se obter as soluções nas concentrações finais desejadas.

**Tabela 2: Sistema de incubação para a indução da peroxidação lipídica no soro diluído 20 vezes**

<b>Carotenóides totais (concentração final)</b>	<b>0 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0,25 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>1,25 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>2,5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>
Soro ( $\mu\text{L}$ )	50	50	50	50	50
Sol. Salina ( $\mu\text{L}$ )	450	450	450	450	450
Sol. ASX 25 $\mu\text{M}$ ( $\mu\text{L}$ )	-----	10	50	100	200
Metanol ( $\mu\text{L}$ )	400	390	350	300	200
$\text{CuCl}_2$ / AAPH	100	100	100	100	100

**Tabela 3: Sistema de incubação para a indução da peroxidação lipídica em homogenato de fígado**

<b>Carotenóides totais (concentração final)</b>	<b>0 µM</b>	<b>0,25 µM</b>	<b>1,25 µM</b>	<b>2,5 µM</b>	<b>5 µM</b>
Homog. fígado (µL)	500	500	500	500	500
Sol. ASX 25 µM (µL)	-----	10	50	100	200
Metanol (µL)	400	390	350	300	200
CuCl <sub>2</sub> / AAPH	100	100	100	100	100

Os sistemas foram preparados em triplicata para cada um dos três grupos, ou seja, astaxantina sintética, astaxantina proveniente do camarão controle e astaxantina proveniente do camarão suplementado. As misturas foram incubadas a 37 °C, com agitação constante, por um período de 4h. Após a incubação, foi realizada a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

#### 4.7.1.3. Medidas de TBARS

Uma das técnicas mais utilizadas para se avaliar a lipoperoxidação é o teste do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados. É volátil, possui baixo peso molecular (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco (pKa=4,46). Em condições apropriadas de incubação, em meio ácido e aquecimento, reage com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

A condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos que podem ser determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência (515 nm e 553 nm). Essa reação, chamada de “teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)”, consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de TBA, em meio ácido e alta temperatura.

No presente estudo, a peroxidação lipídica dos tecidos analisados foi avaliada a partir do conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito previamente por Ohkawa *et al.* (1979). Neste ensaio, após as 4h de incubação na presença do agente oxidante, 250 µL da amostra de soro e/ou homogenato de fígado foram acrescidos a 50 µL de butilhidroxitolueno (BHT) 10 mM, 500 µL de ácido tricloroacético 30%, 500 µL de ácido tiobarbitúrico 1% e 250 µL de

água deionizada. Após 60 min de incubação a 100 °C, as amostras foram resfriadas em gelo e, então adicionado 1,5 mL de n-butanol, homogeneizadas em vortex por 30 s e centrifugadas a 3000 x g por 5 min. A absorbância do sobrenadante foi medida em 532 nm.

#### 4.7.2. Análise da capacidade de seqüestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. O antioxidante em estudo reage com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), convertendo-o em sua forma reduzida (2,2-difenil-1-picrilhidrazina). Nesta reação, a solução de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se mais clara, podendo chegar a tons amarelados e o grau deste descolorimento indica a habilidade do antioxidante em seqüestrar o radical livre (MOLYNEUX, 2003).

A capacidade da astaxantina em seqüestrar o radical livre DPPH foi medida através do método proposto por Chen *et al.* (2009). Alíquota de 0,75 mL da solução de DPPH 0,3 mM, preparada com hexano:tetrahidrofurano (3:1, v/v), foi adicionada a 2,25 mL das diferentes soluções de carotenóides totais ou astaxantina, cujas concentrações finais eram de 5 e 10 µM. As misturas foram agitadas em agitador magnético e os tubos foram deixados em repouso e ao abrigo da luz por 20 min. Posteriormente, a absorbância foi medida usando espectrofotômetro UV (Shimadzu LC-10) a 540 nm. O comprimento de onda para a máxima absorbância do DPPH é de 518 nm. Porém, devido à interferência da absorbância da astaxantina neste comprimento de onda, todas as leituras foram realizadas em 540 nm, conforme descrito por Chen *et al.* (2009) para um ensaio semelhante com o carotenóide licopeno.

O resultado final foi expresso em percentual de inibição, calculada de acordo com a seguinte equação matemática:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} \times 100$$

Onde: Abs do controle = absorbância do controle (solução de DPPH sem antioxidante)

Abs da amostra = absorbância da amostra a ser testada, em presença do DPPH

#### 4.7.3. Determinação da atividade antioxidante a partir do sistema da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

No ensaio da oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, o sistema ao ser submetido às condições de oxidação gera um radical livre a partir da oxidação do ácido linoléico que irá abstrair o hidrogênio da molécula insaturada do  $\beta$ -caroteno. Como resultado da oxidação desta molécula, o sistema perde a sua coloração alaranjada característica que é monitorada espectrofotometricamente de modo a quantificar o grau de inibição da oxidação pelo antioxidante que está sendo testado (MARCO, 1968; MILLER, 1971; ABIDILLE *et al.*, 2005).

Este ensaio baseou-se no método proposto por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971). Uma alíquota de 20  $\mu$ L da solução de  $\beta$ -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 40  $\mu$ L de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 20 mg de Tween 40. Após homogeneização, o clorofórmio foi completamente evaporado em evaporador rotatório a 50 °C. Foram adicionados 150 mL de água destilada sob agitação vigorosa. A emulsão apresentava-se límpida e sua absorvância foi ajustada entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Alíquotas (5 mL) desta emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,2 mL das soluções de carotenóides totais extraídos do músculo dos camarões com concentrações finais de 10 e 20  $\mu$ M. As mesmas foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e a uma solução padrão de astaxantina sintética, previamente padronizada. Nos tubos controle foram adicionados 0,2 mL de solvente (hexano). Foi feita uma leitura inicial imediatamente após a adição das soluções de carotenóides, astaxantina ou do solvente. Posteriormente, a absorvância foi monitorada a cada 15 min durante 2 h em espectrofotômetro UV (Shimadzu LC-10). Os tubos foram mantidos em banho-maria a 50 °C, durante as leituras. Os resultados foram expressos de acordo com os valores de absorvância das amostras.

#### 4.8. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5 experimentos realizados, sendo que cada experimento foi realizado em triplicata. Todos os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias (ANOVA) com medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, com exceção da análise dos dados da Área Sob a Curva (ASC) onde foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste

*post-hoc* de Bonferroni. O nível de significância considerado para todas as análises foi de  $P < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software GraphPad 4 (EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação e a discussão dos mesmos estão apresentados sob a forma de um manuscrito apresentado a seguir. O mesmo será submetido à publicação no periódico *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Fator de Impacto 2,562 (2008), Qualis A1 Internacional.

## **Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos carotenóides totais extraídos do músculo de camarões cultivados *Litopenaeus vannamei***

Fabiana Ourique da Silva<sup>a</sup>, Jane Parisenti<sup>b</sup>, Juliana Fabris Lima Garcia<sup>c</sup>, Edson Luiz da Silva<sup>d</sup>, Marcelo Maraschin<sup>e</sup> e Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte<sup>f</sup>

<sup>a</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88036-001, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>b</sup>Doutoranda em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>c</sup>Doutoranda em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-970, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>e</sup>Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil

<sup>f</sup>Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88036-001, Florianópolis, SC, Brasil

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Campus Universitário – Trindade – 88040-900 – Florianópolis – SC.

Correspondência para: [velutra@yahoo.com.br](mailto:velutra@yahoo.com.br)

### RESUMO

Os carotenóides têm sido bastante investigados como agentes quimiopreventivos, atuando como antioxidantes em sistemas biológicos contra radicais livres e possíveis efeitos deletérios do estresse oxidativo. Dentre eles, a astaxantina (ASX) tem mostrado atividade antioxidante superior aos demais carotenóides. A proposta do presente estudo foi analisar a atividade antioxidante dos carotenóides totais extraídos do camarão, uma vez que este é uma das principais fontes alimentares de astaxantina. Foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides totais (CT) extraídos do músculo de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em cativeiro, sendo um grupo alimentado com ração suplementada com *Haematococcus pluvialis* (CS) como fonte de carotenóides e um grupo controle (CC), alimentado com ração não suplementada, utilizando-se como parâmetros a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e a co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Os resultados mostraram que os CT extraídos dos camarões do grupo suplementado desempenharam uma atividade antioxidante semelhante à astaxantina sintética utilizada como padrão para os diferentes métodos de análise, mostrando um efeito concentração-resposta em todas as análises. Porém, tal atividade antioxidante não foi observada para os CT extraídos do grupo de camarões controle. Com base nesses dados, conclui-se que os CT presentes nos camarões têm a capacidade de agir evitando a peroxidação lipídica, a oxidação de um

ácido graxo poliinsaturado e no seqüestro de radical livre, exercendo desta forma uma ótima atividade antioxidante *in vitro*. Sendo assim, os mesmos parecem exercer um efeito protetor em sistemas biológicos contra o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** carotenóides, astaxantina, camarões *Litopenaues vannamei*, antioxidante, estresse oxidativo, lipoperoxidação, ácido linoléico, DPPH, TBARS.

## INTRODUÇÃO

Os radicais livres como hidroxil e peroxil e espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são formados a partir de processos fisiológicos e bioquímicos no organismo humano, como parte de seu metabolismo normal (1). No entanto, o estresse fisiológico, poluição, cigarro e radiação ultravioleta são alguns dos fatores exógenos que podem levar a um aumento na produção desses agentes oxidantes. Quando em excesso, causam o estresse oxidativo e devido à sua alta reatividade, podem reagir com biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, causando danos oxidativos através de uma série de reações em cadeia (2). Estas reações de oxidação podem estar envolvidas em patologias como aterosclerose, câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e outras doenças, bem como no processo de envelhecimento.

O consumo de antioxidantes oriundos de alimentos tem se mostrado como uma estratégia promissora no combate ao estresse oxidativo, principalmente os antioxidantes do grupo dos carotenóides (3), pois estes têm a capacidade de agir no seqüestro de radicais livres (4) inibindo possíveis reações de oxidação. No entanto, nos últimos anos, o carotenóide astaxantina (3,3'-dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -caroteno-4,4'-diona) tem recebido especial atenção da comunidade científica uma vez que estudos relataram que esta possui uma atividade antioxidante entre 100 e 500 vezes maior que os demais antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol e o  $\beta$ -caroteno (5, 6). Atribui-se essa elevada atividade antioxidante à estrutura química diferenciada da astaxantina, a qual possui em seus anéis terminais grupos cetona e hidroxila (6). Um mecanismo de ação proposto seria por meio dos anéis polares da astaxantina, os quais se

ligariam a espécies reativas de oxigênio na superfície da membrana celular, enquanto a cadeia carbonada agiria no interior da membrana, capturando radicais livres (7). Os grupos hidroxila, nos anéis polares da astaxantina, são apontados como os principais sítios de remoção de radicais livres.

A astaxantina é um carotenóide do grupo das xantofilas, ou seja, possui átomos de oxigênio, além dos átomos de carbono e hidrogênio, em sua molécula. É o principal pigmento carotenóide encontrado em seres aquáticos como o camarão, o salmão, a truta e a lagosta, a qual confere a coloração vermelho-alaranjado dos mesmos. A astaxantina não apresenta atividade pró-vitamina A, mas possui inúmeras propriedades farmacológicas importantes que podem estar envolvidas na prevenção ou no tratamento de doenças como: diabete (8), câncer (9), hipertensão (10), doenças cardíacas (11) entre outras.

Até o momento, as pesquisas que relacionam o papel protetor da astaxantina contra diversas enfermidades têm sido conduzidas com astaxantina sintética ou proveniente de algas como a *Haematococcus pluvialis*, uma das principais fontes dessa xantofila. A astaxantina é o carotenóide majoritário encontrado nos camarões (12), confere a coloração característica desses crustáceos, aumentando a aceitação por parte dos consumidores e, ainda, devido a sua atividade antioxidante, protege-os contra a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e colesterol, presentes em grandes quantidades nos camarões (13), reações estas que provocam a deterioração oxidativa dos pescados. Os camarões, quando em seu habitat natural, obtêm astaxantina a partir da ingestão de microalgas. No entanto, quando cultivados em cativeiro é necessário que seja feita a adição desta xantofila à ração, ou feita a adição de um outro

carotenóide, o qual o camarão seja capaz de bioconverter em astaxantina. Desta maneira, será absorvida e depositada no músculo e exoesqueleto.

Os camarões representam 7% do volume de pescados comercializados mundialmente, movimentando 17% do valor econômico dos produtos de pesca, sendo um produto com grande valor agregado e consumido no mundo todo. Atualmente 70% dos camarões consumidos no mundo provem de fazendas de cultivo (14).

Tolasa et al. (15) demonstraram que 100 g de filé de salmão contêm 676 µg de astaxantina. Porém 100 g de camarão contêm 11000 µg de astaxantina conforme descrito por Boonyaratpalin et al (16), sendo essa uma das principais fontes alimentares dessa xantofila. As funções que a astaxantina desempenha em seres aquáticos estão bem definidas na literatura. Porém, em seres humanos, quando este carotenóide é obtido através da dieta, ainda são poucos e inconclusivos os estudos sobre o papel que o mesmo poderá exercer na prevenção e/ou tratamento de algumas doenças.

Portanto, considerando o aumento do cultivo e comercialização dos camarões *Litopenaues vannamei*, também devido à carência de dados científicos concernentes a atividade antioxidante da astaxantina proveniente de uma fonte alimentar e considerando que dentre todos os carotenóides presentes no camarão, a astaxantina é o majoritário, o presente trabalho teve como objetivo principal, avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides presentes no músculo de camarões da espécie *Litopenaues vannamei*, utilizando diferentes ensaios, com diferentes mecanismos de ação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

As substâncias relacionadas a seguir foram adquiridas da Sigma (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): astaxantina; radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); colesterol, ácido linoléico e  $\beta$ -caroteno. 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) foi adquirido da Wako Chemicals Co. (Tóquio, Japão). Os demais reagentes utilizados, todos de qualidade analítica, foram adquiridos da Vetec (São Paulo, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água destilada ou deionizada.

A astaxantina utilizada para o preparo das rações dos camarões foi proveniente da biomassa microalgal seca da espécie *Haematococcus pluvialis* ALGAMAC AST (Aquafauna Bio-Marine, INC).

### Cultivo dos camarões *Litopenaeus vannamei*

O cultivo dos camarões foi realizado no Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Os camarões foram cultivados em dois grupos experimentais, os quais recebiam uma ração diferenciada, conforme esquema abaixo:

**Camarão grupo controle (CC):** recebeu ração controle, sem adição de carotenóides, porém, os 3 ppm de carotenóides presentes foram provenientes dos componentes da dieta;

**Camarão grupo suplementado (CS):** recebeu ração suplementada com 60 ppm de carotenóides (astaxantina) provenientes da alga *Haematococcus pluvialis*.

Foram utilizados 480 camarões brancos do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) com aproximadamente 10 g cada. Os camarões foram distribuídos em 6 tanques (2 tratamentos, com 3 repetições) com 80 camarões cada. Os camarões foram alimentados por 30 dias, com 3% de ração em relação ao peso corporal, 3 vezes ao dia, em quantidades iguais.

Os parâmetros de qualidade da água (oxigênio, amônia, nitrito e nitrato) foram monitorados semanalmente. Antes do início do experimento, os animais foram alimentados por 5 dias com ração comercial Potimar 35 EXT (Guabi®) isenta de carotenóides para a aclimação.

### **Preparo das rações**

A ração controle foi elaborada com base nos trabalhos de Arredondo-Figueroa et al. (17) e Boonyaratpalin et al. (16). A partir desta, foi preparada a ração com suplementação de astaxantina, através da adição de 5 g da alga *Haematococcus pluvialis*/kg de ração. As rações foram elaboradas no Laboratório de Nutrição do Departamento de Aqüicultura no Centro de Ciências Agrárias, UFSC. A ração foi seca em estufa a 45 °C, por 14 h e acondicionada em sacos plásticos, vedados e congelados até o uso.

### **Extração dos carotenóides totais do músculo dos camarões cultivados**

Após 30 dias de tratamento com as diferentes rações, os camarões foram retirados dos tanques e colocados em banho de gelo e transportados em caixas térmicas para o laboratório. Para o presente

estudo foi utilizada somente a fração carotenóidica extraída do músculo desses crustáceos, uma vez que esta é a parte mais consumida na dieta humana e, conseqüentemente, de maior interesse nutricional. Realizou-se a extração dos carotenóides totais do músculo utilizando o método proposto por Tolasa et al. (15). As amostras de músculo foram pesadas e trituradas em um multiprocessador. Depois, a 5 g da amostra triturada foram adicionados 30 mL de acetona e a mistura então foi homogeneizada em homogeneizador mecânico. Esse processo foi repetido três vezes consecutivas para a completa extração dos carotenóides. Os extratos foram reunidos em um funil de separação no qual foi adicionado 100 mL de água destilada, 0,5 g de NaCl e 40 mL de hexano para a separação dos compostos solúveis em água. A mistura foi mantida no escuro durante 20 min. Para eliminar as impurezas da solução, após os 20 min de repouso, o extrato em hexano foi filtrado em sulfato de sódio anidro em balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume completado com solvente hexano.

### **Quantificação dos carotenóides totais**

Após a extração, a concentração de carotenóides totais das amostras foi obtida a partir da leitura da absorbância do extrato hexânico a 470 nm em espectrofotômetro (Shimadzu LC-10). Os valores obtidos foram lançados em uma curva padrão de astaxantina (Sigma, 98%), previamente elaborada ( $y=0,1847x + 0,0103$ ,  $R^2=0,9951$ ). As análises foram realizadas em triplicata.

Após os procedimentos acima descritos, para evitar uma possível oxidação da amostra devido ao contato com o oxigênio do ar, foi injetado gás nitrogênio nos frascos contendo as amostras. As soluções

foram armazenadas em frascos âmbar, em freezer à temperatura de -12 °C até o momento das análises de quantificação da astaxantina e capacidade antioxidante dos carotenóides totais.

### **Quantificação da astaxantina no extrato carotenóide**

A análise quantitativa da astaxantina no extrato hexânico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. Para tal, foram injetadas 10 µL do extrato em cromatógrafo líquido Shimadzu SP 10A, equipado com coluna C18 de fase reversa (Vydac 201TP54, 250mm x 4.6mm – BioRad) e detector UV/Vis (Shimadzu SPD 10A),  $\lambda=477\text{nm}$ . A fase móvel utilizada consistia de uma solução de metanol:acetonitrila (90:10, v/v), em fluxo de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 13 min e a quantificação da astaxantina foi realizada em comparação com o tempo de retenção da astaxantina padrão (4 a 4,2 min). O teor de astaxantina foi calculado com base em uma curva padrão ( $y = 44231,56364 x$ ,  $R^2 = 0,99024$ ) de astaxantina (Sigma, 98%), sendo considerada a média de 3 injeções sequenciais por amostra.

### **Preparo das soluções para as análises da capacidade antioxidante**

Após a extração dos carotenóides totais do músculo dos camarões e a quantificação dos mesmos e da astaxantina, um volume previamente calculado do extrato hexânico, foi transferido para um frasco âmbar e o solvente evaporado com gás nitrogênio. Os volumes foram calculados para que se obtivesse, após a evaporação do hexano e adição do solvente utilizado em cada análise, uma solução estoque concentrada de carotenóides totais. A partir dessa solução, foram feitas diluições para as

concentrações finais desejadas em cada análise da capacidade antioxidante.

Partindo-se do princípio de que a astaxantina é o carotenóide majoritário encontrado nos camarões, optou-se por fazer a comparação da atividade antioxidante do extrato carotenóidico extraído do músculo dos camarões com a astaxantina sintética (Sigma, 98%). Sendo que, foi preparada uma solução estoque, com os solventes apropriados, e desta fazia-se diluições para as concentrações desejadas em cada ensaio.

### **Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante dos carotenóides totais**

#### **- Análise da proteção contra a peroxidação lipídica pelo método de**

**TBARS:** Para este ensaio foram utilizados soro e homogenato de fígado obtidos de ratos albinos Wistar, machos, adultos, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). No dia das análises, os animais foram previamente anestesiados com mistura de quetamina (Francotar<sup>®</sup>) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum<sup>®</sup>) e, seguidamente realizada a coleta de sangue através de punção cardíaca. Um *pool* de sangue coletado de vários animais foi colocado em tubo de ensaio e submetido à centrifugação a 3000 rpm durante 15 min para a obtenção do soro. Após, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, coletado o fígado. Após a coleta, o órgão foi lavado com solução salina refrigerada, seco e pesado. O homogenato desse tecido foi preparado conforme descrito por Mosimann et al. (18). O sobrenadante do homogenato de fígado bem como o soro obtido foram utilizados para as medidas de TBARS. A concentração de proteínas do homogenato foi determinada usando o ensaio de Bradford (19),

utilizando albumina bovina como padrão. O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e está cadastrado sob o número 23080.008792/2009-60.

Os tecidos foram submetidos à indução da oxidação com cloreto de cobre ( $\text{CuCl}_2$ ), concentração final 0,1 mM, adaptado de Kamada et al. (20), e 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH), concentração final 5 mM, adaptado de Silva et al. (21). Os sistemas foram preparados em triplicata, nos quais eram adicionadas soluções de carotenóides totais nas concentrações finais de 0,25; 1,25; 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  utilizando metanol como solvente. As misturas foram incubadas a 37 °C, com agitação constante, por um período de 4h. Após a incubação, foi realizada a medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Ohkawa (22).

**- Análise da capacidade de seqüestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH):** Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O antioxidante em estudo reage com o radical DPPH, convertendo-o em sua forma reduzida (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) provocando o descolorimento da solução. A capacidade dos carotenóides em seqüestrar o radical livre DPPH foi medida através do método proposto por Chen et al. (23). Foram utilizadas soluções de astaxantina nas concentrações finais de 5 e 10  $\mu\text{M}$ , utilizando hexano:tetrahidrofurano (3:1, v/v) como solvente. Aliquota de 0,75 mL da solução de DPPH 0,3 mM, preparada com hexano:tetrahidrofurano (3:1, v/v), foi adicionada a 2,25 mL das diferentes soluções de carotenóides totais ou astaxantina, cujas concentrações finais eram de 5

ou 10  $\mu\text{M}$ . As misturas foram agitadas em agitador magnético e os tubos foram deixados em repouso e ao abrigo da luz por 20 min. Posteriormente, a absorbância foi medida usando espectrofotômetro UV (Shimadzu LC-10) a 540 nm. O resultado final foi expresso em percentual de inibição.

**- Determinação da atividade antioxidante a partir do sistema da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico:** Este sistema avalia a atividade de inibição, por parte do antioxidante em estudo, de radicais livres (peroxil) gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Os produtos desta reação descoram (oxidam) o  $\beta$ -caroteno. Como resultado da oxidação desta molécula, o sistema perde a sua coloração alaranjada característica que é monitorada espectrofotometricamente e determina a capacidade de uma substância de proteger um substrato lipídico da oxidação. A capacidade dos carotenóides totais em prevenir a degradação oxidativa do ácido linoléico foi realizada segundo o método proposto por Marco (24) e modificado por Miller (25). Uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da solução de  $\beta$ -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250 mL com 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 1 mL de clorofórmio e 20 mg de Tween 40. Após homogeneização, o clorofórmio foi completamente evaporado em evaporador rotatório a 50 °C. Foram adicionados 150 mL de água destilada sob agitação vigorosa. A emulsão apresentava-se límpida e sua absorbância foi ajustada entre 0,6 e 0,7 a 470 nm. Alíquotas (5 mL) desta emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,2 mL das soluções de carotenóides extraídas do músculo dos camarões com concentrações finais de 10  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$  em hexano. As mesmas foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e a uma solução padrão de

astaxantina sintética, previamente padronizada. Nos tubos controle foram adicionados 0,2 mL de solvente (hexano). Foi feita uma leitura inicial imediatamente após a adição das soluções de astaxantina ou do solvente. Posteriormente, a absorvância foi monitorada a cada 15 min durante 2 h. Os tubos foram mantidas em banho-maria a 50 °C, durante as leituras. Os resultados foram expressos de acordo com os valores de absorvância das amostras.

### **Análise estatística**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5 experimentos realizados, sendo que cada experimento foi realizado em triplicata. Todos os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias (ANOVA) com medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, com exceção da análise dos dados da Área Sob a Curva (ASC) onde foi realizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. O nível de significância considerado para todas as análises foi de  $P < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software GraphPad 4 (EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a expansão do cultivo de camarões *Litopenaeus vannamei*, o aumento na comercialização dos mesmos, sendo este um dos principais frutos do mar consumidos em todo o mundo e uma das poucas fontes alimentares de astaxantina, torna-se de extrema relevância o estudo desta xantofila extraída desse crustáceo.

No presente estudo foi avaliada a atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides totais extraídos do músculo de camarões *Litopenaeus vannamei*. Os resultados encontrados sugerem que os carotenóides provenientes dessa fonte alimentar, desempenham uma ótima atividade antioxidante uma vez que foram capazes de promover o seqüestro de radicais livres e inibir a peroxidação lipídica.

Para as análises da atividade antioxidante dos carotenóides totais foram utilizados métodos já descritos na literatura científica. Porém, as técnicas tiveram que ser previamente padronizadas em volumes e concentrações, uma vez que, até o momento, não há relatos científicos que descrevam a avaliação da capacidade antioxidante de carotenóides e astaxantina extraída de camarões e a utilização das técnicas utilizadas neste trabalho.

Assim, inicialmente foi avaliada a capacidade dos carotenóides totais em prevenir a lipoperoxidação em soro e fígado. A figura 1 mostra as medidas de TBARS após a indução da peroxidação lipídica, no soro e no fígado, utilizando-se  $\text{CuCl}_2$  (concentração final 0,1 mM) como agente oxidante. Analisando-se o soro (Figura 1A), verifica-se que os carotenóides extraídos do grupo CS apresentam um efeito protetor contra a lipoperoxidação estatisticamente semelhante ao da astaxantina sintética, sendo que quanto maior a concentração de

carotenóides/astaxantina, uma maior atividade antioxidante é observada. Já a atividade antioxidante dos carotenóides extraídos do grupo CC apresentou-se estatisticamente diferente da astaxantina sintética. Ainda, quando se analisa a área sob a curva obtida da curva concentração-resposta, observa-se mais nitidamente que os níveis médios da peroxidação lipídica observada no grupo CS é semelhante aos níveis obtidos para a astaxantina sintética (Figure 1B). Para o homogenato de fígado, observa-se que os carotenóides provenientes do grupo CS somente preveniram a peroxidação lipídica nas concentrações mais altas (2,5 e 5  $\mu\text{M}$ ) (Figura 1C). Resultado semelhante foi observado para os carotenóides provenientes do grupo CC, onde somente a maior concentração (5  $\mu\text{M}$ ) conseguiu prevenir a lipoperoxidação, porém, com valores estatisticamente diferentes da astaxantina sintética. Entretanto, quando se analisa o gráfico da área sob a curva para este ensaio (Figura 1D), observa-se que o grupo CS apresenta-se estatisticamente diferente do grupo astaxantina sintética, mascarando o efeito protetor observado na análise concentração-resposta (Figura 1C).

A Figura 2 mostra as medidas de TBARS após a indução da peroxidação lipídica, no soro e no fígado, utilizando-se o AAPH (concentração final 5 mM) como agente oxidante. Pode-se observar que o comportamento antioxidante dos carotenóides extraídos dos grupos CC e CS foi semelhante ao ensaio que utilizou o  $\text{CuCl}_2$  como agente antioxidante. Para o soro, os carotenóides extraídos do grupo CS apresentaram uma atividade antioxidante estatisticamente semelhante à astaxantina sintética nas concentrações de 2,5 e 5  $\mu\text{M}$  (Figura 2A). De maneira semelhante para o soro, no homogenato de fígado os carotenóides do grupo CS inibiram a lipoperoxidação, nas concentrações

de 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ , estatisticamente semelhante à astaxantina sintética (Figura 2C). Para o grupo CC, apesar de os carotenóides terem apresentado uma atividade antioxidante na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , esta foi estatisticamente inferior da astaxantina sintética. Da mesma maneira, quando foi utilizado o  $\text{CuCl}_2$  como agente oxidante, a análise da área sob a curva dos dados obtidos tanto no soro quanto no fígado na presença de AAPH encobre a atividade protetora que foi observada quando analisadas as curvas concentração resposta de maneira independente (Figuras 2B e 2D).

Até o presente momento não foi encontrado na literatura científica um trabalho que descreva a utilização da técnica da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico para a quantificação da atividade antioxidante da astaxantina. Porém, a partir do método proposto por Marco (24) e modificado por Miller (25), foi possível a padronização desta técnica para os carotenóides extraídos do músculo dos camarões. Na Figura 3A, observou-se que para a concentração de 10  $\mu\text{M}$  os carotenóides extraídos do músculo do grupo CC não apresentaram atividade antioxidante, pois a curva se sobrepôs à curva do padrão sem antioxidante, não havendo diferença estatística entre as mesmas. Para os carotenóides extraídos do músculo do grupo CS, observou-se que estes apresentam uma atividade antioxidante estatisticamente semelhante à astaxantina sintética em praticamente todo o período analisado, com exceção da análise feita em 105 min de reação, o qual foi o único período de tempo que apresentou diferença estatística quando comparado a astaxantina sintética. O potencial antioxidante observado para os carotenóides do grupo CS pode ser evidenciado na análise da área sob a curva (Figura 3B) onde os dados obtidos para este grupo não

diferem significativamente dos dados obtidos para astaxantina sintética. Na Figura 3C, observou-se que para a concentração de 20  $\mu\text{M}$ , os carotenóides extraídos do grupo CS foram estatisticamente semelhantes à astaxantina sintética no que se refere à proteção do ácido linoléico contra a oxidação em todos os tempos analisados. Analisando os gráficos da área sob a curva, observou-se novamente o perfil protetor que os carotenóides do grupo CS apresentam contra a oxidação do extrato lipídico, sendo este estatisticamente semelhante à astaxantina sintética (Figura 3D).

A capacidade dos carotenóides em seqüestrar o radical livre DPPH, expressa em porcentagem de seqüestro do radical livre DPPH, exibida pelas soluções em estudo, está representada na Figura 4. Vale ressaltar que inicialmente foram realizadas as leituras das absorvâncias das soluções em 517 nm, conforme descrito na literatura, porém com esse comprimento de onda não obtivemos resultados satisfatórios. Posteriormente, as leituras foram realizadas em 540 nm devido à possível interferência da absorvância dos carotenóides, conforme proposto por Chen et al. (23). Evidencia-se que os carotenóides totais extraídos do músculo dos camarões exibiram um perfil antioxidante semelhante à astaxantina sintética, ou seja, quanto maior a concentração, maior a capacidade em seqüestrar o radical livre DDPH. Observa-se que a solução com maior concentração (10  $\mu\text{M}$ ) de astaxantina, tanto para o grupo de camarões CC quanto para o grupo CS, foi a que provocou maior inibição sugerindo um possível efeito concentração-dependente. Resultado semelhante foi encontrado por Sachindra e Bhaskar (26) pesquisando a atividade antioxidante *in vitro* de produtos extraídos de resíduos de camarão e por Rao et al. (27) estudando a atividade

antioxidante de um extrato carotenóidico extraído da alga *Botryococcus brauni*. Apesar da diferença estatística dos grupos CC e CS em relação à astaxantina sintética, observou-se que os carotenóides provenientes do grupo CS apresentaram uma atividade antioxidante semelhante à astaxantina sintética (aproximadamente 75% de inibição). Segundo Gordon (28), a ação antioxidante é baseada na quebra da cadeia do radical livre pela doação de um átomo de hidrogênio. Neste caso, acredita-se que os carotenóides, incluindo a astaxantina, presente no extrato doe, ao radical livre, átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas fenólicos. Sendo assim, pode-se estimar que os carotenóides presentes nos camarões sejam capazes de formar um produto final estável incapaz de propagar futuras reações de oxidação.

Em resumo, os resultados encontrados neste trabalho considerando a atividade antioxidante dos carotenóides extraídos do camarão, corroboram os resultados de outros estudos *in vitro*, os quais utilizam a astaxantina sintética ou proveniente de algas (6, 7, 26).

As análises de CLAE mostraram que o principal carotenóide presente no músculo dos camarões foi a astaxantina nas suas formas livre e esterificada, correspondendo a 75% do total de carotenóides nos dois grupos (dados não mostrados). No entanto, verificamos que o grupo CC apresentou 2,82 mg de astaxantina/kg de músculo de camarão, enquanto o grupo CS apresentou 4,55 mg de astaxantina/kg de camarão. Isso demonstra que, mesmo a partir de uma pequena quantidade de outros carotenóides presentes na ração fornecida aos camarões (grupo CC), estes são capazes de converter os traços de carotenóides em astaxantina.

Como o músculo dos camarões apresenta uma grande quantidade de colesterol e ácidos graxos poliinsaturados, sugere-se que a astaxantina exerça uma atividade antioxidante protegendo esses compostos da oxidação, conforme proposto por Tejera et al. (29) e Palozza et al. (13), evitando assim a formação de radicais livres, como hidroxil e peroxil. Esses radicais, por sua vez, são responsáveis pela formação de outros radicais e hidroperóxidos lipídicos (30). Considerando que os camarões do grupo CS apresentam uma maior concentração de astaxantina no músculo, pode ter ocorrido uma maior proteção por parte deste carotenóide contra possíveis reações de oxidação *in vivo*, no armazenamento do músculo, no momento da extração e durante o armazenamento dos extratos. Sendo assim, neste grupo, a astaxantina pode ter evitado a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados e colesterol quando ainda presente nos crustáceos. Esta proteção pode ser evidenciada quando observada para este grupo uma maior atividade antioxidante, *in vitro*, quando comparada ao grupo CC. Já no grupo CC, o qual apresenta um menor teor de astaxantina, poderia ter resultado em uma maior concentração de compostos oxidados o que poderia estar diminuindo o efeito antioxidante dos carotenóides e, desta forma, interferindo nas análises.

Sabe-se que o excesso de radicais livres e ERO e ERN produzidos nos organismos, devido a fatores internos ou externos, estão envolvidos na etiologia de diversas doenças crônicas, pois têm a capacidade de interagir com biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios. O colesterol e ácidos graxos poliinsaturados amplamente distribuídos em alimentos de origem animal são muito susceptíveis à oxidação. Os ácidos graxos poliinsaturados dos alimentos podem sofrer

uma lipoperoxidação, formando radicais livres e hidroperóxidos, sendo os últimos capazes de iniciar a reação de oxidação do colesterol (31). O pescado está entre os mais propensos à deterioração oxidativa do colesterol devido à alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados em sua fração lipídica e aos níveis relativamente elevados de colesterol, como é o caso do camarão (32). Os derivados da oxidação desses compostos são de grande interesse clínico devido à sua relação com compostos citotóxicos, aterogênicos, mutagênicos e cancerígenos e outros efeitos deletérios (33).

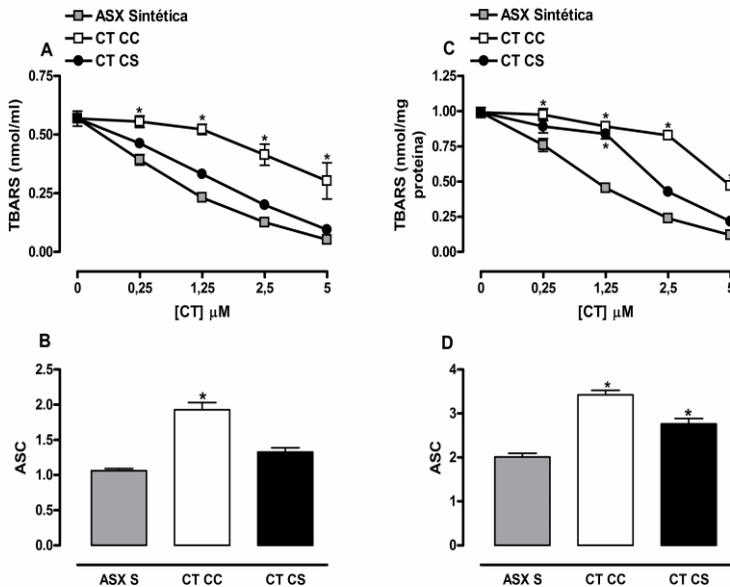
Por fim, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a astaxantina, carotenóide majoritário nos camarões, pode ter exercido uma proteção contra reações de oxidação nos crustáceos. Este fato reflete-se em uma maior atividade antioxidante *in vitro* dos carotenóides presentes nos camarões que receberam uma suplementação de astaxantina na ração. Os carotenóides do grupo suplementado exerceram uma maior proteção contra a lipoperoxidação no soro e homogenato de fígado de ratos, proteção contra a oxidação de um ácido graxo poliinsaturado e maior atividade no seqüestro de radicais livres. Sendo estes resultados preliminares, estudos devem ser conduzidos com o intuito de verificar os possíveis efeitos benéficos *in vivo* do consumo de alimentos que possuam astaxantina como o carotenóide majoritário, como o camarão.

### Abreviaturas

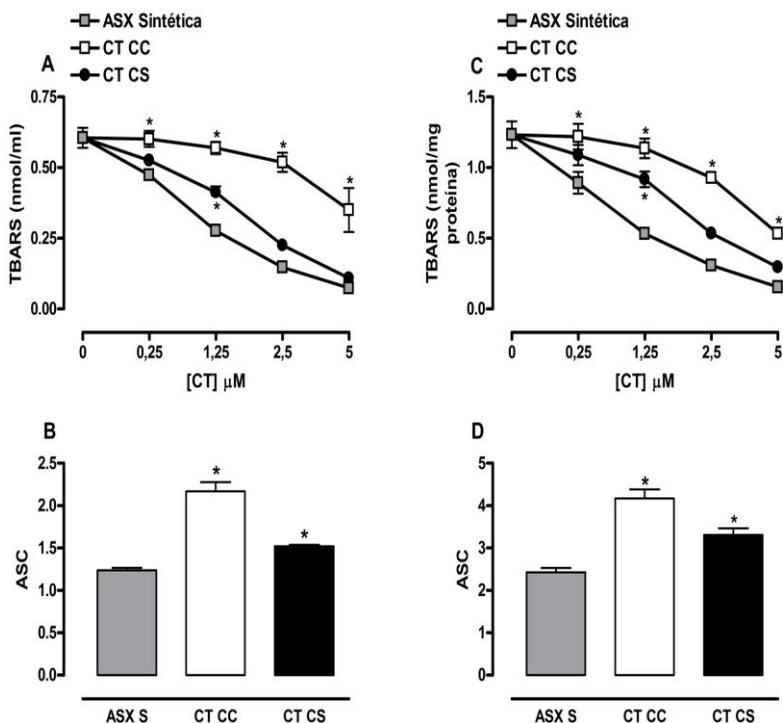
AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloro; ASX, astaxantina; CC, camarão controle; CEUA, Comissão de Ética para o Uso de Animais; CS, camarão suplementado; CT, carotenóides totais; CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência; DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ERO, espécie reativa de oxigênio; ERN, espécie reativa de nitrogênio; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; UFSC, Universidade Federal de Santa Catarina.

### Fontes de Financiamento

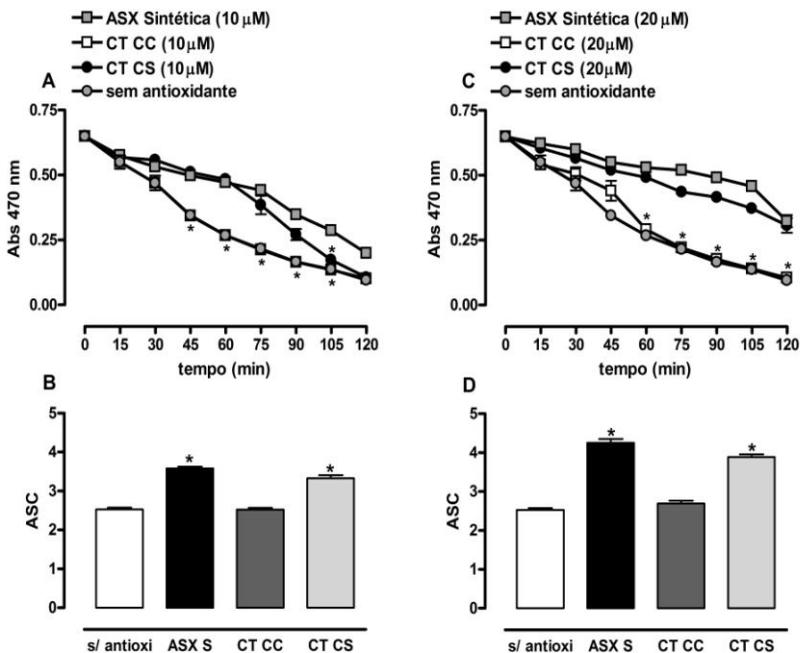
Programa de Pós-Graduação em Nutrição/UFSC e Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina (FAPESC).



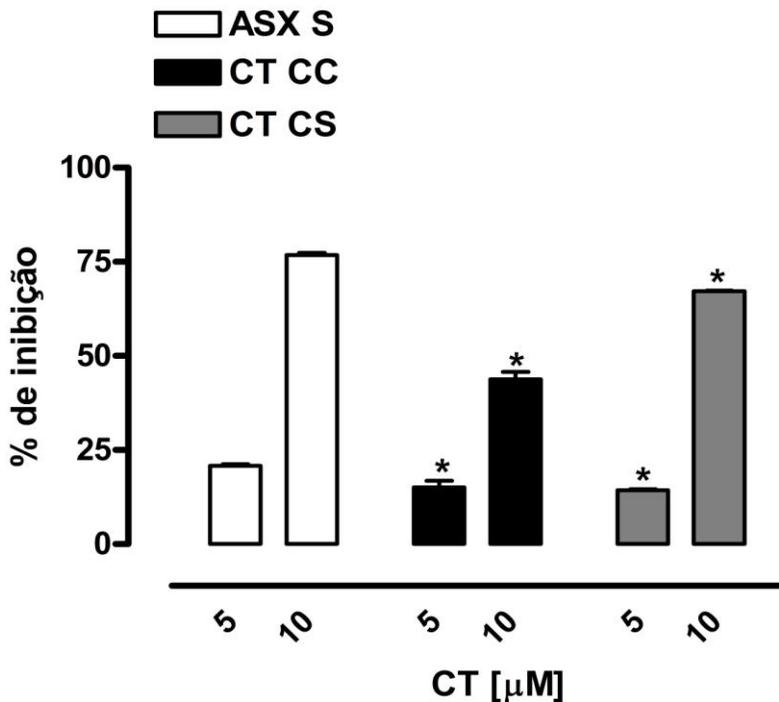
**Figura 1. Avaliação dos níveis de TBARS após a indução de oxidação pelo  $\text{CuCl}_2$  0,1 mM no soro (A) e no homogenato de fígado (C) obtidos de ratos machos Wistar. (B e D) Representam as Áreas Sob as Curvas média dos dados obtidos das curvas concentração- resposta obtidas dos dados da figura A e C, respectivamente. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5 experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0.05$  estatisticamente diferente quando comparado ao grupo astaxantina sintética. ASX = astaxantina sintética; CT CC = carotenóides totais extraídos de camarões controle; CT CS = carotenóides totais extraídos de camarões suplementados.**



**Figura 2.** Avaliação dos níveis de TBARS após a indução de oxidação pelo AAPH 5 mM no soro (A) e no homogenato de fígado (C) obtidos de ratos machos Wistar. (B e D) Representam as Áreas Sob as Curvas média dos dados obtidos das curvas concentração- resposta obtidas dos dados da figura A e C, respectivamente. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5 experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0.05$  estatisticamente diferente quando comparado ao grupo astaxantina sintética. ASX = astaxantina sintética; CT CC = carotenóides totais extraídos de camarões controle; CT CS = carotenóides totais extraídos de camarões suplementados.



**Figura 3. Avaliação da atividade antioxidante dos carotenóides totais extraídos do camarão a partir da oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.** (A e C) Representam as curvas tempo-resposta da oxidação do  $\beta$ -caroteno pelo ácido linoléico na presença de 10 e 20  $\mu$ M de carotenóides, respectivamente. (B e D) Áreas Sob as Curvas média dos dados obtidos da curvas tempo-resposta obtidas dos dados das figuras A e C, respectivamente. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5 experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0.05$  estatisticamente diferente quando comparado ao grupo astaxantina sintética e \*  $P < 0.05$  estatisticamente diferente quando comparado ao grupo sem antioxidante para a ASC. ASX = astaxantina sintética; CT CC = carotenóides totais extraídos de camarões controle; CT CS = carotenóides totais extraídos de camarões suplementados; s/antioxi = sem antioxidante.



**Figura 4. Porcentagem de seqüestro do radical DPPH pelos carotenóides totais extraídos do camarão.** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5 experimentos realizados em triplicata. \*  $P < 0.05$  estatisticamente diferente quando comparado ao grupo astaxantina sintética. ASX = astaxantina sintética; CT CC = carotenóides totais extraídos de camarões controle; CT CS = carotenóides totais extraídos de camarões suplementados.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- (1) Halliwell, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* **1994**, 344, 721-724.
- (2) Di Mascio, P.; Murphy, M. E.; Sies, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherol and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, 53, 194S-200S.
- (3) Rao, A. V.; Rao, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* **2007**, 55, 207-216.
- (4) Palozza, P.; Krinsky, N.I. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. *Methods Enzymol.* **1992**, 213, 403-420.
- (5) Miki, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 141-146
- (6) Naguib, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1150-1154.
- (7) Goto, S.; Kogure, K.; Abe, K. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipids membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Bioch. Bioph. Acta* **2001**, 1512, 251-258.
- (8) Kim, Y.J.; Kim, Y.A; Yokozawa, T. Protection against oxidative stress, inflammation and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 8793-8797.
- (9) Bertram, J. S.; Vine, A. L. Câncer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Bioch. Bioph, Acta.* **2005**, 1740, 170-178.

- (10) Hussein, G.; Goto, H.; Oda, S.; Iguchi, T.; Sankawa, U.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopatological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 684-688.
- (11) Pashkow, F. J.; Watumull, D. G.; Campbell, C. L. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **2008**, *101*, 58D-68D.
- (12) Armenta, R.E.; Guerrero-Legarreta, I. Stability studies on astaxanthin extracted from fermented shrimp byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6095-6100.
- (13) Palozza, P.; Barone, E.; Mancuso, C. The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. *Mol. Cell. Bioch.* **2008**, *309*, 61-68.
- (14) FAO(Food and Agriculture Organization of the United Nation) 2009. Disponível em: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en) . Acesso em: 26 de março de 2010.
- (15) Tolasa, S.; Cakli, S.; Ostermeyer, U. Determination of astaxanthin and cantaxanthin in salmonid. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, *221*, 787-791.
- (16) Boonyaratpalin, M.; Thongrod, S.; Supamattaya, K. Effects of  $\beta$ -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquac. Res.* **2001**, *32*, 182-190.

- (17) Arredondo-Figueroa, J.L.; Pedroza-Islas, R.; Ponce-Palafox, J.T. Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified from red chili (*Capsicum annum*) in comparison to astaxanthin. *Rev. Mex. Ingen. Quim.* **2003**, 2, 101-108.
- (18) Mosimann, A.L.P.; Wilhelm-Filho, D.; Silva, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors* **2006**, 26, 59-70.
- (19) Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- (20) Kamada, Silva, E.L.; Ohnishi-Kameyama, M.; Moon, J-H.; Terão, J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Rad. Res.* **2005**, 39, 185-194.
- (21) Silva, E.L.; Piskula, M.; Terao, J. Enhancement of antioxidant ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, 24, 1209-1216.
- (22) Ohkawa, H.; Ohisshi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, 95, 351-358.
- (23) Chen, J.; Shi, J.; Macnaughton, L.; Kakuda, Y.; Xue, S. J.; Ma, Y.; Zhang, M.; Jiang, Y. The scavenging capacity of combinations of lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin E, and vitamin

- C on the free radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). *J. Food Biochem.* **2009**, 33, 232-245.
- (24) Marco, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Society* **1968**, 45, 594-598.
- (25) Miller, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. *J. Am. Oil Society* **1971**, 48, 91.
- (26) Sachindra, N. M.; Bhaskar, N. *In vitro* antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 9013-9016.
- (27) Rao, A. R.; Sarada, R.; Baskaran, V.; Ravishandar, G. A. Antioxidant activity of *Botryococcus brauni* extract elucidated in vitro models. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 4593-4599.
- (28) Gordon, M. F. The mechanism of antioxidant action in vitro. In *Food Antioxidants*; Hudson, B. J. F., London, U. K., Eds.; Elsevier Applied Science: New York, 1990; pp 1-18.
- (29) Tejera, N.; Cejas, J.R.; Rodríguez, C.; Bjerkeng, B.; Jerez, S.; Bolaños, A.; Lorenzo, A. Pigmentation, carotenoids, lipid peroxides and lipid composition of skin of red porgy (*Pagrus pagrus*) fed diets supplemented with different astaxanthin sources. *Aquaculture* **2007**, 270, 218-230.
- (30) Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **1993**, 49, 481-493.
- (31) Smith, L.L. Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chem. Phys. Lipids.* **1987**, 44, 87-125.
- (32) Johnston, J.J.; Ghanbari, H.A.; Wheeler, W.B.; Kirk, J.R. Characterization of shrimp lipids. *J. Food Sci.* **1983**, 48, 33-35.

- (33) Morales-Aizpurúa, I.C.; Tenuta-Filho, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. *Rev. Bras. Ciên. Farm.* **2002**, 38, 431-442.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão) 2004. Censo da Carcinicultura Nacional 2004. Disponível em:

<http://www.abccam.com.br/TABELAS%20CENSO%20SITE.pdf>.

Acesso em 25 de março de 2010.

ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão) 2007.

Disponível em: <http://www.abccam.com.br/estat.php?estID=3>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2010.

ABCC (Associação Brasileira de Criadores de Camarão) 2009.

Principais pescados exportados entre janeiro de 2007 e julho de 2009.

Disponível em: <http://www.abccam.com.br/estat74.htm> . Acesso em 24 de março de 2010.

ABIDILLE, M.D.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; *et al.*

Anitoxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chem.**, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.

ALMEIDA NETO, M.E.; FREIRE, A.G. Avaliação de consumo

alimentar e textura do exoesqueleto do camarão marinho *Litopenaeus*

*vannamei* (crustacea:penaeidae) em cultivo comercial, durante o ciclo de muda. **B. Instituto da Pesca**, São Paulo, v. 33(2), p. 147-156, 2007.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, and the degenerative diseases of aging. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mut. Res.**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; PATSALIDES, E.; *et al.* Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst.**, v. 127, p. 183-198, 2002.

ARANGO, G.J. Resumen de la evaluación sobre la utilización de astaxantina en nutrición de camarones. **Tercer Simposium Internacional de Nutrición acuícola**. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey Nuevo León, 1996.

ARMENTA, R.E.; GUERRERO-LEGARRETA, I. Stability studies on astaxanthin extracted from fermented shrimp byproducts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 6095-6100, 2009.

ARREDONDO-FIGUEROA, J.L.; PEDROZA-ISLAS, R.; PONCE-PALAFOX, J.T.; *et al.* Pigmentation of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931) with esterified and saponified from red chili (*Capsicum annum*) in comparison to astaxanthin. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 2, p. 101-108, 2003.

ASTROG, P.; GRADELET, S.; BERGES, R.; *et al.* Dietary lycopene decreases initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in rat. **Nutr. Cancer**, v. 29, p. 60-68, 1997.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, p. 1303-1315, 2009.

BASU, S. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 10, p. 1405-1434, 2008.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, p. 233-261, 1996.

BERTRAM, J.S. Carotenoids and gene regulation. **Nutr. Rev.**, v. 57, p. 182-191, 1999.

BERTRAM, J.S.; VINE, A.L. Câncer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1740, p. 170-178, 2005.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BLOCK, G.; DIETRICH, M.; NORKUS, E.P.; *et al.* Factors associated with oxidative stress in human populations. **Am. J. Epidemiol.**, v. 156, n. 3, p. 274-285, 2002.

BOONYARATPALIN, M.; THONGROD, S.; SUPAMATTAYZ, K. Effects of  $\beta$ -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. **Aquac. Res.**, v. 32, p. 182-190, 2001.

BOSE, K.S.; AGRAWAL, B.K. Effect of lycopene from tomatoes (cooked) on plasma antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in grade-I hypertension. **Ann. Nutr. Metabol.**, v. 51, n. 5, p. 477-481, 2007.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSATO, D. **Oxygen, Gene Expression and Cellular**, Marcel Dekker: New York, v. 105, p. 1-25, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND, M.D.; AFFOURTIT, C.; ESTEVES, T.C.; *et al.* Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. **Free Rad. Biol. & Med.**, v. 37, n. 6, p. 755-767, 2004.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J.**, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

BUTTERFIELD, D.A.; CASTEGNA, A.; LAUDERBACK, *et al.*  
Evidence that amyloid  $\beta$ -peptide induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p. 655-664, 2002.

CAMERA, E.; MASTROFRANCESCO, A.; FABBRI, C.; *et al.*  
Astaxanthin, canthaxanthin and beta-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. **Exp. Dermatol.**, v. 18, n. 3, p. 222-231, 2009.

CARR, A.C.; McCALL, M.R.; FREI, B. Oxidation of LDL by mieloperoxidase and reactive nitrogen species- Reaction pathways and antioxidants protection. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, p. 1716-1723, 2000.

CEASER, E.K.; MOELLERING, D.R.; SHIVA, A. Mechanisms of signal transduction mediated by oxidized lipids: the role of the electrophile-responsive proteome. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 32, p. 151-155, 2004.

CERIELLO, A. Oxidative stress and glyceimic regulation. **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 27-29, 2000.

CERQUEIRA, F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O.

Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHANGE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v. 59, n. 3, p. 527-605, 1979.

CHEN, J.; SHI, J.; MACNAUGHTON, L.; *et al.* The scavenging capacity of combinations of lycopene,  $\beta$ -carotene, vitamin E, and vitamin C on the free radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). **J. Food Biochem.**, v. 33, p. 232-245, 2009.

CHEW, B.P. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-caroteno, cantaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. **Anticancer Res.**, v. 19, p. 1849-1853, 1999.

CHIEN, Y.H.; JENG, S.C. Pigmentation of kuruma prawn, *Penaeus japonicus* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. **Aquaculture**, v. 102, p. 333-346, 1992.

CHIEN, Y.H.; PAN, C.H.; HUNTER, B. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. **Aquaculture**, v. 216, p. 177-191, 2003.

CHILDS, M.T.; DORSETT, C.S.; KING, I.B.; *et al.* Effects of shellfish consumption on lipoproteins in normolipidemic men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 51, n. 6; p. 1020-1027, 1990.

CLARK, R.M., YAO, L.; SHE, L.; *et al.* A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions. **Lipids**, v. 35, p. 803-806, 2000.

COMINACINI, L.; ANSELMINI, M.; GARBIN, U.; *et al.* Enhanced plasma levels of oxidized low-density lipoprotein increase circulating nuclear factor- $\kappa$ B activation in patients with unstable angina. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 46, p. 799-806, 2005.

CORAL-HINOSTROZA, G.N.; YTRESTØYL, T.; RUYTER, B.; *et al.* Plasma appearance of unesterified astaxanthin geometrical *E/Z* and optical *R/S* isomers in men given single doses of a mixture of optical 3 and 3' *R/S* isomers of astaxanthin fatty acyl diesters. **Comp. Biochem. Physiol.**, Parte C, v. 139, p. 99-110, 2004.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R. ; *et al.* Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem.**, v. 52, p. 601-623, 2006.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. 194S-200S, 1991.

ELLIOT, R. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1740, p. 147-154, 2005.

ERDMAN Jr., J.W.; BIERER, T.L.; GUGGER, E.T. Absorption and transport of carotenoids. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 691, p. 76-85, 1993.

ERDMAN Jr., J.W. Variable bioavailability of carotenoids from vegetables. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 179-180, 1999.

ESPOSITO, E.; ROTILIO, D.; DI MATTEO, V.; *et al.* A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. **Neurobiol. Aging**, v. 23, p. 719-735, 2002.

FANG, Y-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation) 2003.  
Disponível em: <http://www.fao.org/fi/statist/fisoft/FISHPLUS.asp>.  
Acesso em: 08 de março de 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation) 2009.  
Disponível em:  
[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus\\_vannamei/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Litopenaeus_vannamei/en) .  
Acesso em: 26 de março de 2010.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; MASCIANGELO, S.; BICCHIEGA, V. Effect of phytosterols on copper lipid peroxidation of human low-density lipoproteins. **Nutrition**, v. 26, p. 296-304, 2010.

FLORES, M.; DÍAZ, F.; MEDINA, R.; *et al.* Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. **Aquac. Res.**, v. 38, p. 740-747, 2007.

FREI, B. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. **Crit. Rev. Food Sci.**, v. 35, p. 83-98, 1995.

FREYGANG, Joseane. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Nutrição. **Determinação do colesterol e ácidos graxos em camarões (*Litopenaeus vannamei*) cultivados na região de Santa Catarina e efeito do seu consumo no perfil lipídico de ratos (*Ratus norvegicus*)**. Florianópolis, 2008. 1v. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

GALHARDI, C.M.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; *et al.* Toxicity of copper intake : lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 2053-2060, 2004.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biol. Med.**, v. 7, p. 65-86, 1989.

GEORGE, T.W.; NIWAT, C.; WARRONPHAN, S.; *et al.* Effects of chronic and acute fruit and vegetables juice consumption on

cardiovascular disease risk factors. **Acta Horticult.**, v. 841, p. 201-206, 2009.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 959-975, 2001.

GONG, H.; LAWRENCE, A.L.; GATLIN III, D.M.; *et al.* Comparison of different types and levels of commercial soybean lecithin supplemented in semipurified diets for juvenile *Litopenaeus vannamei* Boone. **Aquac. Nutr.**, v. 7, p. 11-17, 2001.

GOODWIN, T.W. Nature and distribution of carotenoids. **Food Chem.**, v. 5, p. 3-13, 1980.

GOTO, S.; KOGURE, K.; ABE, K. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1512, p. 251-258, 2001.

GRADELET, S.; ASTORG, P.; LECLERE, J.; *et al.* Effects of cantaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. **Xenobiotica**, v. 26, p. 49-63, 1996.

GREENBERG, M.E.; LI, X-M.; GUGIU, B.G.; *et al.* The lipid Whisker model of the structure of oxidized cell membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 2385-2396, 2008.

GRISHKO, V.I.; HO, R.; WILSON, G.L.; *et al.* Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarth. Cartilage**, v. 17, p. 107-113, 2009.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M.E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. **TRENDS Biotech.**, v. 25, n. 5, p. 210-216, 2003.

GUTIERREZ, J.; BALLINGER, S.W.; DARLEY-USMAR, V.M.; *et al.* Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids. The emerging role in signal transduction in vascular cells. **Circ. Res.**, v. 99, p. 924-932, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Meth. Enzymol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3<sup>a</sup> ed. NY: Oxford University Press, 1999. 936 p.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994a.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994b.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, v. 1, p. 358-364, 1987.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critic. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 46, p. 185-196, 2006.

HIRVONEN, T.; VIRTAMO, J.; KORHONEN, P.; *et al.* Intake of flavonoids, carotenoids, vitamin C and E, and risk of stroke in male smokers. **Stroke**, v. 31, p. 2301-2306, 2000.

HOUSTIS, N.; ROSEN, E. D.; LANDER, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, p. 944-948, 2006.

HSIEH, R.J.; KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 33, p. 233-341, 1989.

HUIE, R.E.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Rad. Res. Commun.**, v. 18, p. 195-199, 1993.

HUSSEIN, G.; GOTO, H.; ODA, S.; *et al.* Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin : III. Antioxidant and histopatological effects in spontaneously hypertensive rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 4, p. 684-688, 2006a.

HUSSEIN, G.; SANKAWA, U.; GOTO, H.; *et al.* Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 443-449, 2006b.

IWAMOTO, T.; HOSODA, K.; HIRANO, R.; *et al.* Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. **J. Atheros. Thromb.**, v. 7, p. 216-222, 2000.

JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol. Med.**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JEWELL, C.; O'BRIEN, N.M. Effect of dietary supplementation with carotenoids on xenobiotic metabolizing enzymes in the liver, lung, kidney and small intestine of the rat. **Br. J. Nutr.**, v. 81, p. 235-242, 1999.

JOHNSON, E.A.; AN, G.H. Astaxanthin from microbial sources. **Crit. Rev. Biotech.**, v. 11, n. 4, p. 297-326, 1991.

JOHNSON, E.J. The role of carotenoids in human health. **Nutr. Clin. Care**, v. 5, n. 2, p. 47-49, 2002.

JOHNSTON, J.J.; GHANBARI, H.A.; WHEELER, W.B.; *et al.*  
Characterization of shrimp lipids. **J. Food Sci.**, v. 48, n. 1, p. 33-35,  
1983.

JYONOUCHI, H. Studies of immunomodulating actions of carotenoids  
II. Astaxanthin enhances *in vitro* antibody production to T-dependent  
antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. **Nutr. Cancer**,  
v. 19, p. 269-280, 1993.

JYONOUCHI, H. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity,  
augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones  
and suboptimal doses of antigen. **J. Nutr.**, v. 124, p. 2483-2492, 1995.

JYONOUCHI, H.; SUN, S.; LIJIMA, K.; *et al.* Antitumor activity of  
astaxanthin and its mode of action. **Nutr. Cancer**, v. 36, p. 59-65, 2000.

KAMADA, C.; SILVA, E.L.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; *et al.*  
Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin  
glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. **Free Rad. Res.**, v.  
39, n. 2, p. 185-194, 2005.

KAMATH, B.S.; SRIKANTA, B.M.; DHARMESH, S.M.; *et al.* Ulcer  
preventive and antioxidative properties of astaxanthin from  
*Haematococcus pluvialis*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 590, p. 387-395,  
2008.

KANNER, J.; HAREL, S.; GRANIT, R. Nitric oxide as an antioxidant. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 289, p. 130-136, 1991.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **Internat. J. Food Sci. Technol.**, v. 36, p. 703-725, 2001.

KIM, Y. J.; KIM, Y. A.; YOKOZAWA, T. Protection against oxidative stress, inflammation and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 8793-8797, 2009.

KING, I.; CHILDS, M.T.; DORSETT, C.; *et al.* Shellfish: proximate composition, minerals, fatty acids and sterols. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 90, n. 5, p. 677-685, 1990.

KISTLER, A.; LIECHTI, H.; PICHARD, L.; *et al.* Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. **Arch. Toxicol.**, v. 75, p. 665-675, 2002.

KOH, M.-S.; HWANG, J.-S.; MOON, A-R. Lycopene inhibits proliferation, invasion and migration of human breast cancer cells. **Biomol. & Therap.**, v. 18, n. 1, p. 92-98, 2010.

KURASHIGE, M.; OKIMASU, E.; INOUE, M.; *et al.* Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. **Physiol. Chem. Phys. Med. NMR**, v. 22, p. 27-38, 1990.

KURIHARA, H.; KODA, H.; ASAMI, S.; *et al.* Contribution of the antioxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with restraint stress. **Life Sci.**, v, 70, p. 2509-25020, 2002.

LARSSON, S.C.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. Dietary carotenoids and risk of hormone receptor-defined breast cancer in a prospective cohort of Swedish women. **Eur. J. Cancer**, Article in press, 2010.

LASHERAS, C.; GONZALEZ, S.; HUERTA, J.M.; *et al.* Food habits are associated with lipid peroxidation in an elderly population. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 103, p. 1480-1487, 2003.

LEE, S.H.; MIN, D.B. Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. **J. Agric. Food Chem.**, v. 38, p. 1630-1634, 1990.

LEE, S.J.; BAI, S.K.; LEE, K.S.; *et al.* Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I( $\kappa$ )B kinase-dependent NF- $\kappa$ B activation. **Mol. Cells.**, v. 16, p. 97-105, 2003.

LEE, C.J.; SEET, R.C.S.; HUANG, S.H.; *et al.* Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of Dengue fever, stroke, and Parkinson's disease patients: cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 11, p. 407-420, 2009.

LEE, C-Y.; HUANG, S.H.; JENNER, A.M.; *et al.* Measurement of F2-isoprostanes, hydroxyeicosatetraenoic products, and oxysterols from a single plasma sample. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, p. 1314-1322, 2008.

LEPROIVE, M.; FLAMAN, J.M.; BOBÉ, P.; *et al.* Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. **J. Bio. Chem.**, v. 269, p. 21891-21897, 1994.

LI, Q.; VERMA, I.M. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 725-734, 2002.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Ver. Bras. Cien. Farmac.**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIU, W.; WU, J.Y. Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Appl. Microbiol. Cell. Phys.**, v. 73, p. 663-668, 2006.

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

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-241, 2000.

LYONS, N.M.; O'BRIEN, N.M. Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. **J. Dermatol. Sci.**, v. 30, p. 73-84, 2002.

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and cardiac disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 1, p. 29-38, 2005.

MANABE, E.; HANDA, O.; NAITO, Y.; *et al.* Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling. **J. Cell. Biochem.**, v. 103, n. 6, p. 1925-1937, 2008.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MASON, R.P.; WALTER, M.F.; MCNULTY, H.P.; *et al.* Rofecoxib aumenta a susceptibility of human LDL and membrane lipids to oxidative damage: a mechanism of cardiotoxicity. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 47, p. S7-S14, 2006.

MATSUSHITA, Y. Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin- $\beta$ -glucoside from marine bacterium on PC liposomes. **Fish. Sci.**, v. 66, p. 980-985, 2000.

MCNULTY, H.; BYUN, J.; LOCKWOOD, S.F.; *et al.* Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane

interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1768, p. 167-174, 2007.

MCNULTY, H.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. **Am. J. Cardiol.**, v. 101, p. 20D-29D, 2008.

MENZ, A.; BLAKE, B.F. Experiments on the growth of *Penaeus vannamei* Boone. **J. Experim. Mar. Biol. Ecol.**, v. 48, p. 99-111, 1980.

MIKI, Y. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure Appl. Chem.**, v. 63, p. 141-146, 1991.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **J. Am. Oil Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarim J. Sci. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2003.

MOREIRA, E.A.M.; SHAMI, N.J.S.E. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, p. 227-236, 2004.

MORIEL, D.G.; CHOCIAI, M.; MACHADO, I.M.P. ; *et al.* Effect of feeding methods on the astaxanthin in fed-batch process. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 48, n. 3, p. 397-401, 2005.

MOSIMANN, A.L.P.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E.L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, p. 59-70, 2006.

NAGUIB, Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 1150-1154, 2000.

NAITO, Y.; UCHIYAMA, K.; AOI, W.; *et al.* Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. **BioFactors**, v. 20, p. 49-59, 2004.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, p. 469-484, 2009.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, p. 668-676, 2005.

NIKI, E. Free radicals in the 1900's: from in vitro to in vivo. **Free Radic. Res.**, v. 33, p. 693-704, 2000.

NISHINO, H. Phytochemicals in hepatocellular cancer prevention. **Nutr. Cancer**, v. 61, n. 6, p. 789-791, 2009.

NOGUCHI, N.; GOTOH, N.; NIKI, E. Dynamics of oxidation of low density lipoprotein induced by free radicals. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1168, p. 348-357, 1993.

NORDBERG, J; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biol. Med.**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

O'CONNOR, I.; O'BRIEN, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **J. Dermatol. Sci.**, v. 16, p. 226-230, 1998.

ODEBERG, J.M.; LIGNELL, A.; PETTERSSON, A. ; *et al.* Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in human is enhanced by incorporation of lipid based formulations. **Eur. J. Pharmac. Sci.**, v. 19, p. 299-304, 2003.

OHGAMI, K.; SHIRATORI, K.; KOTAKE, S.; *et al.* Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, p. 2694-2701, 2003.

OHKAWA, H.; OHISSEI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLSON, J.A. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in human. **Pure Appl. Chem.**, v. 66, p. 1011-1116, 1994.

OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Arch. Latinoamerican Nutr.**, v. 49, p. 7-11, 1999.

OSHIMA, S.; SAKAMOTO, H.; ISHIGURO, Y.; *et al.* Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of paprika juice in mem. **J. Nutr.**, v. 127, p. 1475-1479, 1997.

ØSTERLIE, M.; BJERKENG, B.; LIAAEN-JENSEN, S. Accumulation of astaxanthin all E, 9z and 13z geometrical isomers and 3 and 3' optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. **J. Nutr.**, v. 2, p. 391-398, 1999.

ØSTERLIE, M.; BJERKENG, B.; LIAAEN-JENSEN, S. Plasma appearance and distribution of astaxanthin *E/Z* and *R/S* isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. **J. Nutr. Bioch.**, v. 11, p. 482-490, 2000.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; *et al.* Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913-922, 2007.

OWEN, R.W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E.; *et al.* The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **Eur. J. Cancer.**, v. 36, n. 10, p. 1235-1247, 2000.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, I. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 315-424, 2007.

PAIVA, S.; RUSSELL, R. Beta carotene and other carotenoids as antioxidant. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 18, p. 426-433, 1999.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N. I. Antioxidant effects of carotenoids in vivo and in vitro: An overview. **Methods Enzymol.**, v. 213, p. 403-420, 1992.

PALOZZA, P.; BARONE, E.; MANCUSO, C. The protective role of carotenoids against 7-keto-cholesterol formation in solution. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 309, p. 61-68, 2008.

PALOZZA, P.; TORELLI, C.; BONINSEGNA, A.; *et al.* Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. **Cancer Let.**, v. 283, p. 108-117, 2009.

PALMER, C. Hypoxic-ischemic encephalopathy: therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophil, PAF, and free radicals. **Clin. Perinatol.**, v. 22, n. 2, p. 481-517, 1995.

PARISENTI, J. **Efeitos da suplementação da ração com *Haematococcus pluvialis* e lecitina de soja na pigmentação do camarão.** Projeto de Qualificação. Doutorado em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

PARKER, R.S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB J.**, v. 10, p. 542-551, 1996.

PASHKOW, F.J.; WATUMULL, D.G.; CAMPBELL, C.L.  
Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 101, p. 58D-68D, 2008.

PASSOS, Renata dos. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aquíicultura.** Florianópolis, 2007. 1v.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

PATEL, R.P.; MCANDREW, J.; SELLAKE, H.; *et al.* Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1411, p. 385-400, 1999.

PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res. Internat.**, v. 39, p. 791-800, 2006.

PETRI, D.; LUNDEBYE, A-K. Tissue distribution of astaxanthin in rats following exposure to graded levels in the feed. **Comparat. Biochem. Physiol.**, v. 145, p. 202-209, 2007.

PIGA, R.; SAITO, Y.; YOSHIDA, Y.; *et al.* Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidant. **Neuro. Toxicol.**, v. 28, p. 67-75, 2007.

PONTES, C.S.; ARRUDA, M.F. Comportamento de *Litopenaeus vannamei* (Boone) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em função da oferta do alimento artificial nas fases clara e escura do período de 24 horas. **Rev. Bras. Zool.**, v. 22(3), p. 648-652, 2005.

PORTER, N.A.; CALDWELL, S.E.; MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, n. 4, p. 277-290, 1995.

PORTER, N.A. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. **Acc. Chem. Res.**, v. 19, p. 262-268, 1986.

POULSON, H.E.; PRIEME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 7, n. 1, p. 9-16, 1998.

PRINCE, M.R.; FRISOLI, J.K. Beta-carotene accumulation in serum and skin. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 57, p. 175-181, 1993.

RAJASINGH, H.; ØYEHAUG, L.; VAGE, D.I.; *et al.* Carotenoids dynamics in Atlantic salmon. **BMC Biol.**, v. 4, p. 1-15, 2006.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharm. Res.**, v. 55, p. 207-216, 2007.

RICCIONI, G. Carotenoids and cardiovascular disease. **Curr. Atheroscl. Rep.**, v. 11, n. 6, p. 434-439, 2009.

RICHARDSON, L.S.; SUBBARAO, K.V.; ANG, L.C. Biochemical indices of peroxidation in Alzheimer's and control brains. **Trans. Am. Soc. Neurochem.**, v. 21, p. 113, 1990.

RICHIE, F.C.; MARTINS MORAES, J.E. **Revista do BNDS**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 26, p. 309-314, dezembro 2006.

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

ROCK, C.L. Carotenoids: biology and treatment. **Pharmacol. Ther.**, v. 75, p. 185-197, 1997.

ROMANCHIK, J.E.; MOREL, D.W.; HARRISON, E.H. Distributions of carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. **J. Nutr.**, v. 125, p. 2610-2617, 1995.

RUSSE, R.; FLEMING, I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. **J. Vasc. Res.**, v. 33, p. 181-194, 1996.

SALA, A.; RECIO, M.D.; GINER, R.M.; *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 54, n. 3, p. 365-371, 2002.

SAMOCHA, T.M.; PATNAIK, S.; SPEED, M.; *et al.* Use of molasses as carbon source in limited discharge nursery and grow-out systems for *Litopenaeus vannamei*. **Aquac. Eng.**, v. 36, p. 184-191, 2007.

SANTOCOMO, M.; ZURRIA, M.; BERRETTINI, M.; *et al.* Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 85, p. 205-215, 2006.

SCHROEDER, W.A.; JOHNSON, E.A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 18374-18379, 1995.

SCHULZ, E.; ANTER, E.; KEANEY, J.F.Jr. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1093-1104, 2004.

SEAP (Secretaria Especial da Aquicultura e da Pesca) 2005. Estatística da Aquicultura e Pesca no Brasil – ano 2005. Disponível em:

[http://www.presidencia.gov.br/estrutura\\_presidencia/seap/estatistica/](http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/estatistica/) .

Acesso em: 10 de fevereiro de 2010.

SERRANO, M.; BLASCO, M. A. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 715-722, 2007.

SETNIKAR, I.; SENIN, P.; ROVATI, L.C. Antiatherosclerotic efficacy of policosanol, red yeast rice extract and astaxanthin in the rabbit. **Arzneim. Forsch. Drug Res.**, v. 55, n. 6, p. 312-317, 2005.

SHEN, H.; KUO, C-C.; CHOU, J.; *et al.* Astaxanthin reduces ischemic brain injury in adult rats. **FASEB J.**, v. 23, p. 1-11, 2009.

SHOWALTER, L.A.; WEINMAN, S.A.; ØSTERLIE, M.; LOCKWOOD, S.F. Plasma appearance and tissue accumulation of non-esterified, free astaxanthin in C57BL/6 mice after oral dosing of a disodium disuccinate diester of astaxanthin (Heptax TM). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 137, p. 227-236, 2004.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **Eur. J. Biochem.**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidant. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 1315S-1321S, 1995.

SIES, H. What is oxidative stress? In: Keaney, J. F. Jr., ed. **Oxidative stress and vascular disease**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-8.

SILVA, E.L.; PISKULA, M.; TERAJO, J. Enhancement of antioxidant ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 24, p. 1209-1216, 1998.

SOLARSKA, K.; LEWINSKA, A.; KAROWICZ-BILINSKA, A.; *et al.* The antioxidant properties of carnitine in vitro. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 15, n. 1, p. 90-97, 2010.

SONG, Y.; COOK, N.R.; ALBERT, C.M.; *et al.* Effects of vitamins C and E and beta-carotene on the risk of type 2 diabetes in women at high risk of cardiovascular disease: a randomized controlled trial. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 90, n. 2, p. 429-437, 2009.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. Reactive oxygen species: From radiation to molecular biology. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 899, p. 191-208, 2000.

STAHL, W.; SCHWARZ, W.; SIES, H. Human serum concentrations of all-*trans*-beta-carotene and alpha-carotene but not 9-*cis*-beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina*. **J. Nutr.**, v. 123, p. 847-851, 1993.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Mol. Aspect. Med.**, v. 24, p. 345-351, 2003.

SUGANUMA, K.; NAKAJIMA, H.; OHTSUKI, M.; *et al.* Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts. **J. Dermatol. Sci.** *Artigo In Press*. Disponível em [www.scopus.com](http://www.scopus.com)

SUPAMATTAYA, K.; KIRIRATNIKOMA, S.; BOONYARATPALIN, M.; *et al.* Effect of a Dunaliella extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture**, v. 248, p. 207-216, 2005.

TAK, P.P.; FIRESTEIN, G.S. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 7-11, 2001.

TAKEDA, S.; BANDO, N.; YAMANISHI, R. Ingested beta-carotene enhances glutathione level and up-regulates the activity of cysteine cathepsin in murine splenocytes. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 72, n. 6, p. 1595-1600, 2008.

TANAKA, T.; MORISHITA, Y.; SUZUI, M.; *et al.* Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. **Carcinogenesis**, v. 15, p. 15-19, 1994.

TANAKA, T.; KAWAMORI, T.; OHNISHI, M.; *et al.* Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary

administration of naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 2957-2963, 1995.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomed. Pharmacoth.**, v. 58, p. 100-110, 2004.

THOMSON, C.A.; STENDELL-HOLLIS, N.R.; ROCK, C.L.; *et al.* Plasma and dietary carotenoids are associated with reduced oxidative stress in women previously treated for breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.**, v. 16, n. 10, 2007.

TOLASA, S.; CAKLI, S.; OSTERMEYER, U. Determination of astaxanthin and cantaxanthin in salmonid. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 221, p. 787-791, 2005.

TORBATI, D.; CHURCH, D.F.; KELLER, J.M.; *et al.* Free radical generation in the brain precedes hyperbaric oxygen-induced convulsions. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 13, p. 101-106, 1992.

TORRISSEN, O.J.; HARDY, R.W.; SHEARER, K.D. Pigmentation of salmonids-Carotenoid deposition and metabolism. **Crit. Rev. Aquat. Sci.**, v. 1, p. 209-225, 1989.

TURUJMAN, S.A.; WAMER, W.G.; WEI, R.R. Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured

salmon fed synthetic astaxanthin. **J. AOAC Internat.**, v. 3, p. 622-632, 1997.

UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and modulator of oxidative stress. **Prog. Lipid Res.**, v. 42, p. 318-343, 2003.

UCHIYAMA, K.; NAITO, Y.; HASEGAWA, G.; *et al.* Astaxanthin protects  $\beta$ -cells against glucosa toxicity in diabetic db/db mice. **Redox Report**, v. 7, n. 5, p. 290-293, 2002.

UTTARA, B.; SINGH, A.V.; ZAMBONI, P.; *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Cur. Neuropharm.**, v. 7, p. 65-74, 2009.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; *et al.* Fress radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN HET HOF, K.H.; WEST, C.E.; WESTSTRATE, J.A.; *et al.* Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. **J. Nutr.**, v. 130, p. 503-506, 2000.

YAMADA, S.; TANAKA, Y.; SAMESHIMA, M.; *et al.* Pigmentation of Prawn (*Penaeus japonicus*)with carotenoids I. Effect of dietary astaxanthin,  $\beta$ -carotene and cantaxanthin on pigmentation. **Aquaculture**, v. 87, p. 323-330, 1990.

YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KAIMYA, Y.; *et al.* Free radical oxidation and hemolysis of erythrocytes by molecular oxygen and their inhibition by vitamin E. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 32, p. 475-479, 1986.

YOSHIKAWA, T. Free radicals and their scavengers in Parkinson's disease. **Eur. Neurol.**, v. 33, p. 60-68, 1993.

YOSHIDA, Y.; KODAI, S.; TAKEMURA, S.; *et al.* Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid, hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols from physiological samples. **Anal. Biochem.**, v. 379, p. 105-115, 2008.

YOUDIM, M.B.H.; LAVIE, L. Selective MAO-A and B inhibitors, radical scavengers and nitric oxide synthase inhibitors in Parkinson's disease. **Life Sci.**, v. 55, p. 2077-2082, 1994.

YOUNG, L.S.; TATE, S.; LIGHTBODY, J.H.; *et al.* The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. **Free Radi. Biol. Med.**, v. 18, n. 5, p. 833-840, 1995.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 385, p. 20-27, 2001.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mut. Res.**, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

YUN-ZHONG, F.; SHENG, Y.; GUOYAO, W. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

WANG, X.D.; KRINSKY, N.I.; MARINI, R.P.; *et al.* Intestinal uptake and lymphatic absorption of beta-carotene in ferrets: a model for human beta-carotene metabolism. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. G480-G486, 1992.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN, M.E.; *et al.* Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, p. 577-583, 2002.

WEST, J.D.; MARNETT, I.J. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 19, p. 173-194, 2006.

WOLZ, E.; LIECHTI, H.; NOTTER, B.; *et al.* Characterization of metabolites of astaxanthin in primary cultures of rat hepatocytes. **Drug Metab. Dispos.**, v. 27, p. 456-462, 1999.

WU, T-H.; LIAO, J-H.; HOU, W-C. ; *et al.* Astaxanthin protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2418-2423, 2006.

ZARIPHEH, S.E.J.W. Factors that influence the bioavailability of xantophylls. **J. Nutr.**, v. 132, p. 531S-534S, 2002.

ZHENG, M.; STORZ, G. Redox sensing by prokaryotic transcription factors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 1-6, 2000.

ZHOU, Q.C.; LI, C.C.; LIU, C.W.; *et al.* Effects of dietary lipid sources on growth and fatty acid composition of juvenile shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquac. Nutr.**, v. 13, p. 222-229, 2007.

ZIELONKA, J.; KALYANARAMAN, B. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis – a critical commentary. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 45, p. 1217-1219, 2008.

ZMIJEWSKI, J.W.; LANDAR, A.; WATANABE, A.; *et al.* Cell signaling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 1385-1389, 2005.