



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS



EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE ASTAXANTINA E LIPÍDEOS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS ω -3 A PARTIR DE RESÍDUOS DE CAMARÃO-ROSA (*Farfantepenaeus paulensis*)

Andrea del Pilar Sánchez Camargo

Engenheira Química – Universidade Nacional da Colômbia

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

Orientador

Dissertação apresentada à comissão julgadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos** pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas-São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sánchez Camargo, Andrea del Pilar
Sa55e Extração supercrítica de astaxantina e lipídeos ricos em ácidos
graxos ω -3 a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus
paulensis*) / Andrea del Pilar Sánchez Camargo. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2010.

Orientador: Fernando Antonio Cabral
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Extracção supercrítica. 2. Camarão-rosa. 3. Ácidos graxos
Omega-3. 4. Co-solvente. I. Cabral, Fernando Antonio. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Supercritical extraction of astaxanthin and lipids with high content of ω -3
from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus Paulensis*)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Supercritical extraction, Shrimp Waste, Fatty acids ω -3,
Co-solvent

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Fernando Antonio Cabral

Maria Angela de Almeida Meireles

Patricia Franco Leal

Data de defesa: 05/05/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
(Orientador – DEA/FEA/ UNICAMP)

Prof. Dra. Maria Angela de Almeida Meireles
(Membro - DEA/ FEA/ UNICAMP)

Dra. Patricia Franco Leal
(Membro - INOVA/ UNICAMP)

Dra. Losiane Cristina Paviani Diehl
(Suplente - DEA/ FEA/ UNICAMP)

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
(Suplente - FEQ/ UNICAMP)

Campinas, 2010.

*Aos meus pais, Mariana e Alberto,
Pelo apoio incondicional em todos os momentos
da minha vida e por acreditar em mim sempre!*

*Aos três engenheiros que eu mais quero
Wilson, César e Leonardo....*

Com amor, dedico.

Agradecimentos.

Ao **DEUS** meu senhor, por ser a luz no meu caminho, a fonte de água viva e um lugar onde me refugiar!

A minha família, por ser meu apoio constante neste lindo caminho, obrigada pela torcida sempre. De maneira especial gostaria de agradecer **a minha mãe**... sem você simplesmente isto não teria acontecido, não conheço amor mais puro e imenso que o teu...esse amor me trouxe até aqui. Obrigada mãe!! Ao **Camilo** pelo seu apoio e carinho sincero desde o começo do mestrado, pelos momentos compartilhados de alegria e tristeza e pelo exemplo de entrega e profissionalismo nesta carreira. Muito Obrigada!.

Ao professor **Dr. Fernando Antonio Cabral**, obrigada pela oportunidade de crescer ao seu lado, pela confiança, pela ajuda nos momentos de dificuldade, pelos ensinamentos e sempre disponibilidade. Sinto-me muito orgulhosa de ter sido sua orientada e parte da sua equipe.

À banca examinadora pelas valiosas correções e sugestões que foram de grande importância na redação final desta dissertação.

À professora **Dra. Maria Angela de Almeida Meirelles**, por ter aberto as portas do LASEFI para a realização das extrações com co-solvente. Muito obrigada pela ajuda e pela confiança!

Aos meus queridos amigos **Hugo e Margarita**, pela amizade incondicional e hospitalidade, pelo inesgotável carinho e conselhos nos momentos difíceis. Quero muito vocês!

Aos meus amigos, **Glaucia Santos, Maitê Cuevas, Maria Cristina (Titi) Villamán, Helmut Navarro, Junko Tsukamoto, Glaucia Hirata, Elen Frascareli, Mirko Chavez, Juliana Albarelli, Diego Tresinari, Ángela Farias, Silvia Alcazar, Aldirene Amorim, Andreia Anshau, Natalia Prieto** e muito especialmente ao **Julio Rodriguez e à Natália Carareto** (Deus abençoe vocês sempre!!) pela força do dia-a-dia e por fazer do Brasil minha casa mesmo estando tão longe. Nunca vou esquecer vocês, são muito importantes para mim!.

Aos meus amigos que torceram por mim desde a Colômbia, Claudia Naizaque, Liliana Navarro, Adriana Pedraza, Johana Sánchez, Alex Racine e Alexandra Cardenas, obrigada pelo apoio e pelas palavras de ânimo nos momentos de saudades.

Aos meus companheiros de “luta” no EXTRAE, Guilherme, Irede, Thiago, Simone, Losi, Bruna, Erika, Ana Lidia, Thomas, Rodrigo, Hugo, Cesar, Mariana, Marcelo e Luis, obrigada pelos momentos compartilhados, pelos bate-papos e pela palavra otimista no momento oportuno, nunca vou esquecer aquela frase insígnia “ao final tudo dá certo”.

Ao professor, **Dr. Eduardo Batista** pela amizade, momentos de descontração e palavras de apoio.

A Glaucia Helena Carvalho e Ari Astini, pela valiosa assessoria na realização das extrações supercríticas com co-solvente.

Ao pessoal do Laboratório de Óleos e Gorduras, pela assessoria e ajuda com as análises de cromatografia gasosa.

À **FAPESP** (Processo No. 2008/52829-0) agradeço enormemente pelo financiamento que fez possível o desenvolvimento deste mestrado no Brasil.

*Deus nos conceda, a cada dia, uma
página de vida nova no livro do tempo.
Aquilo que colocarmos nela, corre por
nossa conta.*

(Chico Buarque)

*Hay una fuerza motriz más
poderosa que el vapor, la
electricidad y la energía atómica:
la voluntad.*

(Albert Einstein)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AUTOR: Andrea del Pilar Sánchez Camargo.

TÍTULO: Extração supercrítica de astaxantina e lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*)

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral – EXTRAE –DEA / FEA – UNICAMP

RESUMO

O rendimento de processamento e a composição centesimal dos resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) foram investigados. Os resultados indicaram que nos resíduos de camarão (cabeça, casca e caudas liofilizadas) apresenta-se um alto conteúdo protéico (48,8% b.s.) e um alto nível de resíduo mineral (27,0% b.s.). Os resíduos de camarão apresentaram um baixo teor de lipídeos (4,9% b.s.), embora seja alto quando comparado com outra classe de camarões capturados no Brasil. A composição de ácidos graxos mostrou que os lipídeos extraídos contém um alto teor de ácidos graxos insaturados, principalmente EPA (C20:5; n-3) e DHA (C22:6; n-3). A fim de estabelecer um processo eficiente e ambientalmente amigável da recuperação de lipídeos e astaxantina (ASX) (o principal carotenóide e antioxidante presente nos resíduos), foram comparados três tipos de processo de extração: a) Extração com solvente orgânico, b) Extração supercrítica com CO₂, tendo como variáveis de processo, pressão (200-400 bar) e temperatura (40-60°C) e c) Extração supercrítica com CO₂ e etanol como co-solvente, variando a concentração do etanol na mistura de solvente extrativo (5, 10 e 15% m/m). Os resultados mostraram que a máxima quantidade de astaxantina extraída do resíduo foi de 53 ± 2 µg de ASX/g de resíduo b.s., quando empregado como solvente uma mistura 60% (v/v) n-hexano em álcool isopropílico (IPA). Por sua vez, a extração com CO₂ supercrítico, mostrou que a melhor condição de extração dos carotenóides foi a 370 bar e 43°C

(20,72 µg ASX/g de resíduo b.s.). Observou-se que a pressões maiores do que 300 bar e temperaturas entre 40 e 50 °C, os extratos atingiram concentrações de astaxantina maiores de 1000 µg ASX/g de extrato b.s, valor similar ao encontrado na extração com IPA e n-hexano, mostrando a extração supercrítica como uma tecnologia alternativa. O uso de co-solvente mostrou um aumento na extração tanto de lipídeos quanto de astaxantina, indicando que a maior condição de extração destes compostos foi atingida quando utilizo-se 15% m/m de etanol (93,8% na recuperação de lipídeos e 62,8% na recuperação de astaxantina). Por sua parte, a extração dos ácidos graxos poliinsaturados aumentou conforme a temperatura e a pressão aumentaram e a medida que era adicionado etanol ao CO₂. A astaxantina foi identificada em todos os extratos por meio da comparação com o seu padrão puro por cromatografia de camada delgada (CCD) e quantificada por espectrofotometria.

Palavras-chave: Extração supercrítica, astaxantina, camarão-rosa, ácidos graxos ω -3, co-solvente.

MASTHER THESIS

AUTHOR: Andrea del Pilar Sánchez Camargo

TÍTULO: Supercritical extraction of astaxanthin and lipids with high content of ω -3 from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus Paulensis*)

MAJOR PROFESSOR: Dr. Fernando Antonio Cabral – EXTRAE –DEA / FEA – UNICAMP

ABSTRACT

The yield processing by-products and the proximate composition of shrimp waste from the redspotted shrimp (*Penaeus paulensis*) was investigated. Shrimp's waste (freeze-dried head, shell and tail) was found of high protein content (48,8 % dry wt.) and high level of ash (27,0 % dry wt.). The shrimp waste had low lipid content (4,9% dry wt.), although it was higher than other kind of shrimp captured in Brazil. The fatty acid compositions showed that the lipids had high content of fatty acids unsaturated, mainly EPA (C20:5; n-3) and DHA (C22:6; n-3). In order to establish an efficient and environmentally friendly recovery of lipids and astaxanthin (ASX) (the major carotenoid and antioxidant present in the waste) was compared three types of extraction process: a) extraction with organic solvents, b) Supercritical CO₂ extraction, with the process variables pressure (200-400 bar) and temperature (40-60 °C) and c) extraction with supercritical CO₂ and ethanol as cosolvent, varying the concentration of ethanol in the extractive solvent mixture (5 , 10 and 15% (w/ w)).The results showed that the maximum amount of astaxanthin extracted from the residue was 53,30 µg ASX / g of waste (dry wt.), when used as solvent a mixture of hexane and isopropyl alcohol (IPA) at a ratio of 60: 40 (% v/v). The supercritical CO₂ extraction, showed that the best condition of extraction of carotenoids was 370 bar and 43 °C (20,72 µg ASX / g of waste dry wt.). It was observed that the higher pressure of 300 bar and temperatures between 40 and 50 ° C, reached concentrations of astaxanthin in the extract over 1000 ASX µg/g

extract, this value was similar to that extraction with the extraction with IPA and n-hexane, showing the supercritical extraction as a competitive technology. The use of co-solvent showed an increase in both lipid and astaxanthin extraction, showing that the optimum extraction of these compounds was achieved when used 15% (w/w) ethanol (93.8 % lipid recovery and 62.8 % astaxanthin recovery). With regard, the extraction of polyunsaturated fatty acids, their content in the extract was improved as the temperature and pressure increased and as ethanol was added to CO₂. Astaxanthin was identified in all extracts by comparing with their standard pure by Thin Layer Chromatography (TLC) and quantified by spectrophotometry.

Keywords: Supercritical CO₂ extraction, astaxanthin, shrimp pink, fatty acids ω -3, co-solvent.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 Introdução e justificativa.....	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	4
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Produção e mercado do camarão	5
2.2 Camarão-rosa	8
2.3 Geração de resíduos do processamento do camarão	8
2.4 Componentes do resíduo de camarão	9
2.4.1 Lipídeos e ácidos graxos ω -3	10
2.4.2 Carotenóides: Astaxantina	15
2.4.2.1 <i>Fontes naturais de astaxantina</i>	17
2.4.2.2 <i>Astaxantina como antioxidante</i>	21
2.5 Extração de lipídeos e carotenóides com solventes orgânicos.....	23
2.6 Extração com fluidos supercríticos.....	24
2.6.1 Fluido Supercrítico (SCF)	24
2.6.2 Processo de extração com fluidos supercríticos	25
2.6.3 Taxa de extração supercrítica: transferência de massa	28
2.6.4 Extração com fluidos supercríticos usando etanol como co-solvente....	29
2.7 Extração supercrítica de lipídeos e astaxantina com fluidos supercríticos	30
2.7.1 Extração de lipídeos	30
2.8 Referências Bibliográficas.....	41
3. RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DE CAMARÃO-ROSA	51
3.1 Resumo.....	51
3.2 Material e Métodos.....	51
3.2.1 Material.....	51
3.2.2 Rendimento de processamento.....	52
3.2.3 Metodologia Analítica	52
3.2.3.1 <i>Composição centesimal aproximada</i>	52
3.2.3.2 <i>Conteúdo de lipídeos totais</i>	53
3.2.3.3 <i>Extração dos carotenóides presentes no resíduo</i>	54
3.2.3.4 <i>Quantificação de carotenóides totais como astaxantina</i>	55

3.2.3.5	<i>Composição de ácidos graxos</i>	56
3.2.3.6	<i>Identificação da astaxantina e demais carotenóides por meio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	57
3.3	Resultados e Discussão.....	57
3.3.1	Aspectos gerais da amostra de camarão-rosa	57
3.3.2	Rendimento de processamento.....	58
3.3.3	Composição centesimal do resíduo liofilizado	61
3.3.4	Composição em ácidos graxos dos lipídeos extraídos do resíduo.....	63
3.3.5	Extração e quantificação dos carotenóides como astaxantina	66
3.3.6	Identificação de astaxantina por CCD	68
3.4	Conclusões	69
3.5	Referências Bibliográficas.....	71
4.	EXTRAÇÃO SUPERCÍTRICA DE LIPÍDEOS E ASTAXANTINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE CAMARÃO-ROSA.....	77
4.1	Resumo.....	77
4.2	Material e Métodos.....	78
4.2.1	Material.....	78
4.2.2	Solvente de extração supercrítica	78
4.2.3	Preparo da amostra.....	78
4.2.3.1	<i>Liofilização</i>	78
4.2.3.2	<i>Moagem e análise da granulometria do resíduo</i>	79
4.2.4	Umidade	80
4.2.5	Determinação da densidade real das partículas	80
4.2.6	Determinação da densidade aparente e da porosidade de leito (ϵ).....	80
4.2.7	Extração com solvente orgânico.....	80
4.2.8	Delineamento experimental	81
4.2.9	Extração com dióxido de carbono supercrítico	83
4.2.9.1	<i>Unidade experimental</i>	83
4.2.9.2	<i>Procedimento geral de extração</i>	84
4.2.10	Estudo da etapa de extração supercrítica.....	85
4.2.11	Cálculo do rendimento global de extração	86
4.2.12	Cálculo do rendimento de extração de astaxantina	87
4.2.13	Cálculo da concentração de astaxantina no extrato	87
4.2.14	Cálculo da recuperação de óleo e astaxantina.	88
4.2.15	Metodologia Analítica.....	88
4.2.15.1	<i>Quantificação de carotenóides como astaxantina</i>	88
4.2.15.2	<i>Identificação da astaxantina por meio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD)</i>	89

4.2.15.3	<i>Composição de ácidos graxos no extrato</i>	89
4.3	Resultados e Discussão.....	89
4.3.1	Acondicionamento da amostra	89
4.3.2	Moagem e granulometria da partícula.....	91
4.3.3	Umidade.....	91
4.3.4	Densidade real, densidade aparente e porosidade.....	91
4.3.5	Ensaio de extração supercrítica.....	92
4.3.5.1	<i>Cinética de extração - Curvas Globais de Extração (OEC)</i>	92
4.3.5.2	<i>Resultados do planejamento experimental 2² (DCCR)</i>	96
4.3.5.3	<i>Análise dos efeitos das condições de processo sobre as variáveis resposta</i>	97
4.3.6	Eficiência de recuperação de óleo.....	106
4.3.7	Recuperação de astaxantina	108
4.3.9	Validação experimental	113
4.3.10	Identificação da astaxantina por CCD.....	114
4.4	Conclusões	116
4.5	Referências Bibliográficas.....	118
5.	EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA USANDO ETANOL COMO CO-SOLVENTE....	123
5.1	Resumo.....	123
5.2	Material e Métodos.....	124
5.2.1	Material.....	124
5.2.2	Solventes usados na extração supercrítica	124
5.2.3	Extração supercrítica.....	124
5.2.3.1	<i>Unidade experimental</i>	125
5.2.3.2	<i>Procedimento de extração</i>	126
5.2.4	Cálculo de rendimento de extração e recuperação de óleo	128
5.2.5	Cálculo de rendimento de extração e recuperação de astaxantina	128
5.2.6	Composição em ácidos graxos no extrato.....	128
5.3	Resultados e Discussão.....	129
5.3.1	Efeito do etanol sobre o rendimento de extração de óleo	129
5.3.2	Efeito do etanol sobre o rendimento de extração de astaxantina.....	131
5.3.3	Efeito do etanol sobre o perfil de ácidos graxos no extrato	134
5.4	Conclusões.....	138
5.5	Referências Bibliográficas.....	140
6.	CONCLUSÕES GERAIS.....	143
7.	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	147
8.	APÊNDICE.....	149

Lista de Tabelas

Tabela 2.1.- Principais espécies de camarões capturados no Brasil	7
Tabela 2.2.- Teor de lipídeos e conteúdo de EPA e DHA de amostras de carne de camarão da espécie <i>penaeus</i>	13
Tabela 2.3.- Teor de lipídeos totais e conteúdo de EPA e DHA em resíduos de camarão de diferentes espécies.....	14
Tabela 2.4.- Principais fontes naturais de Astaxantina.....	18
Tabela 2.5.- Alguns estudos realizados da extração de astaxantina a partir de crustáceos.....	21
Tabela 2.6.- Comparação entre a extração de lipídeos por solventes e fluidos supercríticos.....	31
Tabela 2.7.- Alguns estudos de extração supercrítica de lipídeos e astaxantina.....	34
Tabela 3.1.- Peso do camarão e rendimento de processamento das partes.	58
Tabela 3.2.- Rendimento de processamento (%) dos componentes do corpo de diferentes espécies de camarão.....	60
Tabela 3.3.- Composição química aproximada do resíduo de duas espécies de camarão-rosa.	61
Tabela 3.4.- Conteúdo de lipídeos em resíduos de camarão de diferentes espécies	63
Tabela 3.5.- Perfil de ácidos graxos (g/100 g de ácidos graxos totais) dos lipídeos totais extraídos do camarão-rosa pela metodologia de Manirakiza et al.(2001)	64
Tabela 3.6.- Rendimento de extração e concentração de astaxantina no resíduo do camarão-rosa (<i>Penaeus paulensis</i>).....	66
Tabela 4.1. - Valores dos fatores estudados no DCCR na extração supercrítica.....	81
Tabela 4.2.- Matriz do planejamento para o estudo da extração supercrítica.....	82
Tabela 4.3.- Densidade aparente do resíduo de camarão-rosa.	92
Tabela 4.4.- Resultados do estudo da cinética de extração do resíduo de camarão-rosa.	92

Tabela 4.5.- Resultados obtidos da extração supercrítica de acordo a matriz do DCCR.	96
Tabela 4.6.- Efeito dos fatores sobre as variáveis analisadas segundo o DCCR.....	97
Tabela 4.7.- Coeficientes de regressão do modelo de segunda ordem para as variáveis resposta do DCCR.	98
Tabela 4.8.- Relação entre SQep/ SQTotal para as variáveis resposta estudadas.....	99
Tabela 4.9.- Recuperação de óleo por extração com solventes e por extração supercrítica.	107
Tabela 4.10.-Porcentagens de recuperação de astaxantina na extração supercrítica relativa a extração com n-hexano/IPA.....	108
Tabela 4.11.-Composição de ácidos graxos (porcentagem de ácidos graxos) dos lipídeos extraídos a partir de camarão-rosa (<i>Farfantepenaeus Paulensis</i>) usando SC-CO ₂ sob diferentes pressões e temperaturas e a metodologia Soxhlet.	110
Tabela 4.12.-Resultados da validação experimental dos modelos obtidos no planejamento experimental DCCR (T=40 °C, P=400 bar)	113
Tabela 4.13.-Conteúdo de EPA e DHA em algumas condições de processo estudadas.	114
Tabela 5.1.- Condições experimentais usadas nas extrações supercríticas.....	125
Tabela 5.2.- Composição de ácidos graxos %(m/m) dos lipídeos extraídos a partir de camarão-rosa (<i>Farfantepenaeus paulensis</i>) usando SC-CO ₂ e etanol como co-solvente.	135

Lista de Figuras

Figura 2.1. - Alguns países produtores de camarão no continente americano, discriminados em aquicultura e pesca extrativa para o ano 2007.....	6
Figura 2.2.- Classificação dos lipídeos de origem animal.....	10
Figura 2.3.- Família dos ácidos graxos ω -3.....	12
Figura 2.4.- Estrutura química da Astaxantina	15
Figura 2.5. - Isômeros configuracionais da Astaxantina.....	16
Figura 2.6.- Diagrama de Equilíbrio para uma substância pura.	24
Figura 2.7.- Esquemas típicos das curvas globais de extração (OEC).....	28
Figura 3.1.- Fotografia da biometria de um camarão-rosa (<i>Penaeus paulensis</i>) representativo da amostra. (a) Camarão inteiro. (b) Subprodutos: cabeça, casca e cauda.	57
Figura 3.2.- Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato contendo carotenóides presentes no camarão rosa. (a) Extrato IPA: n-hexano. (b) Padrão puro de Astaxantina (>93%).	68
Figura 4.1.- Esquema da unidade experimental para extração supercrítica.....	84
Figura 4.2.- Curvas de cinética de extração a 50 °C em diferentes níveis de pressão,	93
Figura 4.3.- Curvas de cinética de extração, (Δ) T=43°C, P= 230 bar (Ens.1), ($\bullet$) T=43°C, P= 370 bar (Ens. 2), (+) T=57°C, P= 230 bar (Ens.3), (*) T=57°C, P= 370 bar (Ens.4).....	94
Figura 4.4.- Curvas de cinética de extração a 300 bar em diferentes níveis de temperatura, (O) T= 40 °C (Ens. 5), ($\times$) T=50 °C (média dos ensaios 9a e 9b), ($\blacktriangle$) T=60°C (Ens. 6).	95

Figura 4.5.- (a) Superfície de resposta e (b) curvas de contorno do rendimento global.....	100
Figura 4.6.- (a) Superfície de resposta e (b) curvas de contorno do rendimento de extração de astaxantina (μg Astaxantina/ g resíduo (b.s.)) em função da pressão (bar) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de extração.	102
Figura 4.7.- (a) Superfície de resposta e (b) curvas de contorno da concentração de astaxantina (μg ASX/ g extrato) no extrato em função da pressão (bar) e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de extração.	105
Figura 4.8.- Cromatografia de Camada Delgada dos extratos supercríticos do camarão-rosa sobre sílica gel.	115
Figura 5.1.- Diagrama da unidade experimental para extração supercrítica empregando co-solvente – LASEFI/DEA-FEA-UNICAMP	125
Figura 5.2.- Efeito do co-solvente sobre o rendimento de extração e a recuperação de óleo. Condições de extração: 300 bar, 50°C	129
Figura 5.3.- Efeito do co-solvente sobre o rendimento de extração e a recuperação de astaxantina. Condições de extração: 300bar, 50°C	131
Figura 5.4.- Efeito do co-solvente sobre a concentração de astaxantina no extrato. Condições de extração: 300bar, 50°C	133
Figura 5.5.- Efeito do co-solvente na recuperação dos ácidos Eicosapentaenóico (EPA) e Docosahexaenóico (DHA). Condições de extração: 300bar, 50°C	137

NOMENCLATURA E ABREVIATÖES

Símbolo	Nome
ALA	Ácido alfa-linolênico
ASX	Astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona)
BHT	Butilhidroxitoluol
b.u.	Base úmida
b.s.	Base seca
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
d_a	Densidade aparente
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DHA	Ácido docosahexanóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
d_r	Densidade real.
EPA	Ácidos eicosapentaenóico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GRAS	Generally Recognized As Safe (Geralmente Reconhecidos como seguros)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IPA	Álcool Isopropílico
IPEF	Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais
%(m/m)	Porcentagem massa por massa
% (m/v)	Porcentagem massa por volume
OEC	Curvas Globais de extração
Pc	Pressão Crítica (bar)
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados

R_f	Fator de retenção
SC-CO ₂	Dióxido de carbono no estado supercrítico
SCF	Fluido no estado supercrítico
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SUDEPE	Superintendência de Desenvolvimento da Pesca
SFE	Extração com fluido supercrítico
S/F	Razão entre massa de solvente e massa de matéria-prima de alimentação
T_c	Temperatura crítica (°C)
UA	Unidades de absorbância
% (v/v)	Porcentagem volume por volume
X_o	Rendimento global de extração

Letras gregas

ε	Porosidade do Leito
ρ	Densidade do CO ₂
ω	Posição das duplas ligações que são contadas a partir da extremidade metila nos ácidos graxos.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Introdução e justificativa

Os resíduos gerados durante o processo de beneficiamento do camarão representam cerca de 50 % em peso do camarão “*in natura*” e são constituídos de cabeça, casca e cauda (HEU et al.; 2003, SACHINDRA et al.; 2005, OGAWA et al., 2007). Em razão do aumento no consumo e na produção mundial do camarão devido ao emergente mercado da aquicultura, a indústria pesqueira tem focado no destino apropriado destes resíduos, os quais causam um sério problema ao meio ambiente como resultado da sua disposição inadequada, sem nenhuma tentativa de uso (SACHINDRA et al., 2005). Estes resíduos são subprodutos economicamente aproveitáveis, pois possuem proteínas de alta qualidade, quitina, cálcio, minerais, carotenóides como a astaxantina e lipídeos com alto teor em ácidos graxos ω -3, pelo qual existe grande interesse no desenvolvimento de alternativas de uso com o fim de gerar produtos de valor agregado (SHAHIDI et al., 1992; IBRAHIM et al., 1999; NARGIS et al., 2006; ASSUNÇÃO E PENA, 2007, RØDDE et al., 2008).

A astaxantina é um carotenóide que pertence à família das xantofilas, sendo o principal pigmento encontrado em animais aquáticos como crustáceos e salmonídeos (SAITO E REGIER, 1971; YAMAGUCHI et al. 1986; SACHINDRA et al. 2005, HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). Esta molécula possui 40 átomos de carbono e contém dois anéis terminais em uma cadeia de duplas ligações conjugadas. Nos seus anéis terminais, apresenta grupos OH e óxi, tornando a molécula ligeiramente polar. A astaxantina é principalmente utilizada como pigmento nas rações animais na carcinicultura, embora também é utilizada como antioxidante na indústria de alimentos e de fármacos. Tem sido reportado que apresenta uma atividade antioxidante 10 vezes maior do que carotenóides como a zeaxantina, luteína, cantaxantina e β -caroteno, e 100 vezes maior que α -tocoferol

(HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). A astaxantina possui propriedades antiinflamatórias e apresenta efeitos contra o câncer e diabetes, proporciona benefícios ao sistema imunológico, a saúde visual e a doenças cardiovasculares (HUSSEIN et. al., 2006; GUERIN et al., 2003).

Os ácidos graxos ω -3, conhecidos pelo seu potencial nutracêutico, são importantes na diminuição do colesterol no sangue e na prevenção de doenças cardíacas. Ainda são essenciais na formação do cérebro e retina de recém-nascidos, principalmente de prematuros (SIMOPOULOS, 2001).

Em geral, os carotenóides e lipídeos são solúveis em solventes não-polares e tradicionalmente tem-se usado solventes deste tipo para extraí-los (MERCADANTE, 2008). No entanto, esta metodologia de extração diminui a estabilidade dos carotenóides devido à oxidação e, além disso, são necessárias grandes quantidades de solventes para obter rendimentos apreciáveis (DELGADO - VARGAS e PAREDES - LÓPEZ, 2003). As atuais limitações na regulamentação no uso de diversos solventes orgânicos em processos de extração de alimentos funcionais e suplementos farmacêuticos têm redirecionado a estudos de processos que empregam solventes do tipo GRAS (*Generally Recognized As Safe*), como por exemplo, o dióxido de carbono no estado supercrítico (SC-CO₂). O CO₂ é inerte, não tóxico, não inflamável, de baixo custo, sendo ideal para uso na indústria de alimentos, já que o extrato e resíduos obtidos pelo processo de extração são isentos de traços de solventes orgânicos.

Além disto, a extração com SC-CO₂ permite o processamento com temperaturas amenas (sua temperatura crítica é 31 °C), o que é especialmente adequado quando compostos termolábeis estão presentes, como é o caso dos carotenóides e dos lipídeos com alto teor de ácidos graxos polinsaturados. Outra vantagem é a sua fácil separação do extrato após o processo de extração, apenas pela redução da pressão às condições normais. Também pode ser citado a

rapidez no processamento dos materiais, devido à baixa viscosidade, alta difusividade do solvente supercrítico, e a eficiência de separação, com alta seletividade entre os produtos extraídos, tornando-a um processo competitivo frente a outras tecnologias tradicionais (BRUNER, 2005).

Pelo exposto, objetiva-se neste trabalho, avaliar a extração de lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 e astaxantina a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*), usando dióxido de carbono supercrítico como solvente e álcool etílico como co-solvente. Para isto, inicialmente o resíduo foi caracterizado quanto a seu rendimento de processamento, composição centesimal, perfil de ácidos graxos e conteúdo de carotenóides totais (Capítulo 3). Logo após, para o estudo da extração supercrítica, foi avaliada a influência da pressão (200-400 bar) e da temperatura (40-60 °C) sobre o rendimento global de extração, o rendimento de extração de astaxantina, a concentração de astaxantina e o perfil de ácidos graxos no extrato. Além disso, os carotenóides presentes no resíduo foram identificados por cromatografia de camada delgada (CCD) (Capítulo 4). Assim, empregando a condição que apresentou o melhor rendimento de extração de lipídeos com SC-CO₂ puro, foi investigado o efeito do uso de co-solvente (5, 10, 15 % m/m), sobre os rendimentos de extração global e de astaxantina (Capítulo 5), e a sua influência na extração de ácidos graxos poliinsaturados. Espera-se que o projeto tenha impacto direto no aproveitamento de resíduos para a oferta de produtos de alto valor agregado para uso na indústria de alimentos e farmacêutica.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da temperatura, pressão e o uso de dióxido de carbono supercrítico como solvente e etanol como co-solvente no rendimento de extração de astaxantina e de lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 a partir de resíduos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).

1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as amostras de resíduo de camarão-rosa quanto ao rendimento de processamento, composição centesimal, perfil de ácidos graxos e conteúdo de carotenóides;
- Obter dados experimentais de rendimento de extração e eficiência de recuperação de carotenóides e lipídeos em função das variáveis operacionais (temperatura, pressão);
- Comparar o rendimento de extração entre a extração com SC-CO₂ e a extração usando hexano como solvente;
- Avaliar o efeito do uso de diferentes concentrações do etanol como co-solvente, sobre o rendimento de extração de lipídeos e astaxantina, bem como na extração de ácidos graxos poliinsaturados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção e mercado do camarão

O camarão, capturado e cultivado (aquicultura) é o produto pesqueiro mais importante comercializado no âmbito internacional. A produção mundial de camarão para o ano 2007 foi de 6,52 milhões de t (4,3 %¹ do volume total da pesca), tendo crescido 2,15 % em relação ao ano anterior. Desse total, 50,2 % vêm da aquicultura e o restante da pesca. A produção resultante da aquicultura se destaca com taxas médias de crescimento de 12,5 % ao ano, enquanto a pesca tem decrescido em média 0,55 % entre 2003 e 2007 (Food and Agriculture Organization - FAO, 2007), isto devido ao fato que a atividade extrativista tem sido controlada em boa parte do planeta como tentativa de evitar desastres ecológicos mais significativos que os que já foram presenciados (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - SEBRAE, 2008).

O mercado internacional do camarão é operado com dois grandes grupos desse crustáceo: os do gênero *pandalídeos* (extraídos de águas frias oceânicas de latitude norte) e os do gênero *penaídeos* (pescados em águas marinhas influenciadas pelos trópicos ou cultivados em viveiros). Duas espécies cultivadas predominam no mercado internacional, com cerca de 70,0 % do volume ofertado: *Penaeus monodon*, no Oriente, e o *Litopenaeus vannamei*, no Ocidente. As principais espécies são as seguintes: Tigre Asiático (*Penaeus monodon*); Camarão Cinza do Ocidente (*Litopenaeus vannamei*); Camarões Brancos da Ásia (*Farfantepenaeus merguensis* e *Feneropenaeus indicus*); Camarão Branco da China (*Farfantepenaeus chinensis* ou *orientalis*); Camarão Azul Ocidental (*Litopenaeus stylirostris*); e Camarão Kuruma Japonês (*Marsupenaeus japonicus*) (SEBRAE, 2008)

¹ Não são contabilizadas plantas aquáticas.

O hemisfério oriental é responsável pela maior parte da produção mundial do camarão cultivado e capturado em 2007 (78,14 % do total), sendo o sudoeste da Ásia o principal produtor, incluindo os seguintes países por ordem de importância: China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Índia, Bangladesh e Filipinas. Em relação ao continente americano, a produção de 2007 chegou a 1,14 milhões de toneladas com uma proporção de 17,47% do total mundial, sendo Canadá o maior produtor. O Brasil, ao finalizar o referido ano com 100.542 toneladas, consolidou-se como o sexto maior produtor de camarão no continente. Quanto à aquicultura destacou-se como terceiro, depois de México e Equador, como pode-se observar na Figura 2.1 (FAO, 2007).

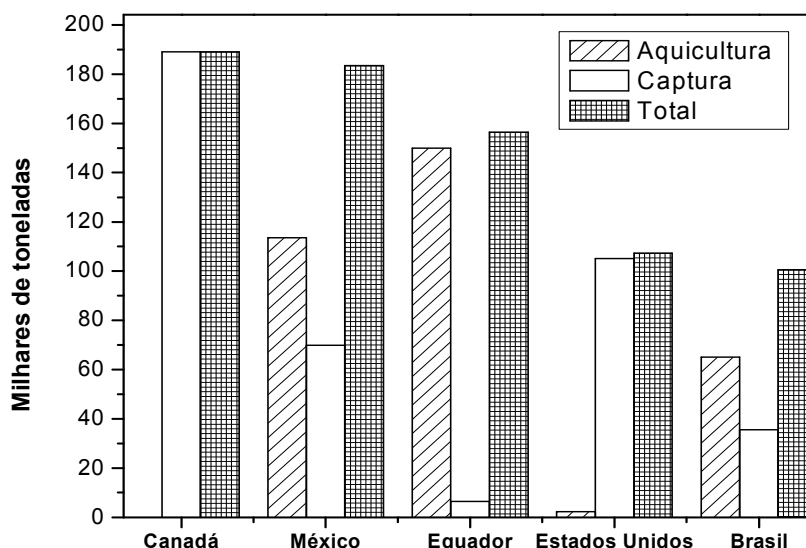


Figura 2.1. - Alguns países produtores de camarão no continente americano, discriminados em aquicultura e pesca extrativa para o ano 2007.

Da produção nacional de camarão para o ano 2007, a carcinicultura (cultivo de camarões) ocupou 65,5% do total, sendo o principal ramo da aquicultura marinha no Brasil. A carcinicultura marinha viveu um período de forte crescimento entre 1998 e 2003, ano em que produziu mais de 90 mil toneladas. A partir daí teve início um período de crise que se estendeu até 2005, quando se registrou

produção de 65.000 t – nível que tem se mantido até as últimas estatísticas do ano 2007 (DE PAIVA, 2007; SEBRAE, 2008).

A oferta de camarões de cultivo predomina no Brasil, principalmente nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Bahia (IBAMA, 2007). Conforme dados publicados pelo IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis– (IBAMA, 2007), os principais camarões cultivados no Brasil são o *Litopenaeus vannamei* (camarão cinza) quanto à carcinicultura marinha, e a *Macrobrachium rosenbergii* (camarão da Malásia) na carcinicultura de água doce.

Em relação ao camarão capturado, os maiores produtores são os estados do Pará, Maranhão, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (IBAMA, 2007). A pesca de camarão realizada na costa do Estado de São Paulo e águas adjacentes é uma das mais importantes para a economia pesqueira no litoral sudeste do Brasil, sendo dirigida principalmente ao camarão-sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e ao camarão-rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis*) (GRAÇA-LOPES et al., 2002). As principais espécies capturadas no Brasil são apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1.- Principais espécies de camarões capturados no Brasil

Nomes Vulgares	Sinonímia	Família	Nomenclatura científica
Camarão-barba-ruça	Camarão-serrinha ou ferrinho	Penaeidae	<i>Artemesia longinaris</i>
Camarão-branco	Camarão-legítimo	Penaeidae	<i>Litopenaeus schmitti</i>
Camarão-rosa	Camarão-pistola	Penaeidae	<i>Farfantepenaeus paulensis</i>
		Penaeidae	<i>Farfantepenaeus brasiliensis</i>
		Penaeidae	<i>Farfantepenaeus subtilis</i>
Camarão-santana	Camarão-vermelho	Penaeidae	<i>Peloticus muelleri</i>
Camarão-sete-barbas	--	Penaeidae	<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>

Fonte: Adaptado IBAMA, 2007.

O camarão rosa (*Farfantepenaeus brasiliensis*, *Farfantepenaeus paulensis*), atingiu uma produção nacional (por captura) de 8238 t no ano 2007, representando 12,6 % em relação à produção total. O principal produtor deste crustáceo para o ano 2006 foi estado do Rio Grande do Sul, seguido por Santa Catarina, Alagoas, Rio de Janeiro e São Paulo, este último com uma produção de 289,5 t. O crescimento da produção no ano 2007 em relação a ano 2006 foi de aproximadamente 75,2 % no estado de Rio Grande do Sul (IBAMA, 2007).

2.2 Camarão-rosa

O camarão-rosa, *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967) (GUSMÃO et al., 2005) é um crustáceo marinho da família dos *peneídeos*, encontrado desde Cabo Frio (Rio de Janeiro – RJ) ao longo da plataforma continental do Brasil e do Uruguai, até o nordeste da Argentina. A principal área de pesca de *P. Paulensis* no litoral brasileiro estende-se de Santos (São Paulo) a Torres (Rio Grande do Sul). Existem duas zonas de alta produção pesqueira, a mais importante, ocorre em frente ao estado de Santa Catarina, e a outra entre Santos e a Ilha de São Sebastião (litoral norte do estado de São Paulo). No estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande do sul), a espécie ocorre o ano todo, sendo mais abundantes entre os meses de dezembro a maio (GUSMÃO et al., 2005).

2.3 Geração de resíduos do processamento do camarão

Durante o processamento de beneficiamento do camarão, são removidas as suas porções não consumíveis como a cabeça, casca e cauda, as quais correspondem a aproximadamente 50 % do peso da matéria-prima, dependendo da espécie, do seu tamanho e do procedimento empregado de descasque. Na literatura existem poucas informações acerca do rendimento do processo de beneficiamento do camarão no caso dos crustáceos de origem nacional. Somente

alguns autores (HEU et al., 2003, SACHINDRA et al., 2005) apresentam valores de 45-50 % de carne, 33-45 % de cabeça, e 11 e 15 % de casca e cauda, para camarões da espécie *penaeus*.

No Brasil, existe uma legislação específica referente aos resíduos, que é controlada pela SUPERINTENDÊNCIA DE DESENVOLVIMENTO DA PESCA (SUDEPE), por meio da portaria nº 203 de 03 de abril de 1970. Esta portaria proíbe o lançamento em águas interiores e no mar territorial brasileiro, os resíduos de pescado resultantes de sua escamação, evisceração e decapitação (IPEF - Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais-, 2009). De tal modo, uma preocupação da indústria pesqueira está focalizada no destino adequado e/ou reaproveitamento desses resíduos, para que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas ou evitadas. Tais resíduos são constituídos por óleos, proteínas, cálcio e pigmentos, pelo qual existe grande interesse em desenvolver alternativas de uso com vistas a gerar produtos de valor agregado (SHAHIDI et al., 1992; HOLANDA, 2004; ASSUNÇÃO e PENA, 2007). Estudos feitos sobre o aproveitamento destes resíduos incluem extração enzimática de carotenoproteínas (SIMPSON e HAARD, 1985), o estudo do seu valor nutricional no uso como ração para peixes (NUNES et al., 1978; NARGIS et al., 2006), elaboração de produtos flavorizantes (TAKESHITA, 1981) e a extração de quitina e quitosana (LEE e PENISTON, 1982; GILDBERG e STENBERG, 2001; RØDDE et al., 2008). Uma possível alternativa de grande agregação de valor para este material é sua utilização para extração de lipídeos e carotenóides, por existir potencial e demanda destes produtos pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e de ração (OGAWA et al., 2007).

2.4 Componentes do resíduo de camarão

O resíduo do camarão é constituído principalmente de proteína (25-50%), quitina (25-35%), sais minerais (15-35%), lipídeos e pigmentos (SHAHIDI et al., 1992, IBRAHIM et al., 1999, NARGIS et al., 2006), cujas porcentagens variam de

acordo com a espécie, localização da pesca, partes constituintes e variação sazonal. Tais diferenças devem-se a fatores biológicos e/ou ambientais, como a alimentação, maturidade sexual, temperatura da água e estação do ano (HOLANDA, 2004).

2.4.1 Lipídeos e ácidos graxos ω -3

Os lipídeos presentes em animais marinhos são constituídos principalmente por triglicerídeos em uma faixa de massa molecular de 500 - 1200 Da, monoglicerídeos, diglicerídeos e ácidos graxos livres. Em menor quantidade contém outros componentes de importante valor como retinol, esqualeno, tocoferóis, colesterol, ésteres de colesterol, ceras, gomas e fosfolipídios (MUKHOPADHYAY, 2000). Existe uma classificação para os lipídeos, sendo do tipo polar e não polar que é de grande importância nos processos de extração. A Figura 2.2 mostra um esquema com a sua classificação.

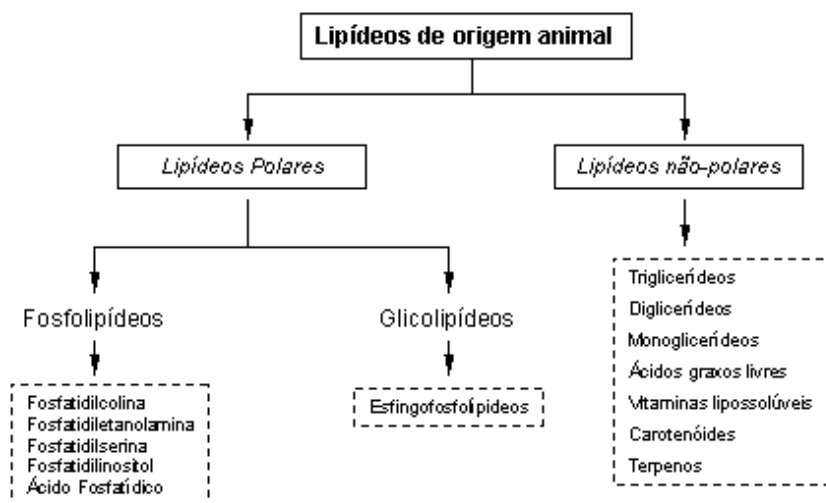


Figura 2.2.- Classificação dos lipídeos de origem animal.

(Adaptado de Mukhopadhyay, 2000).

Óleos marinhos contêm tipicamente ácidos graxos de cadeia linear que apresentam de 14 a 22 ou mais átomos de carbonos principalmente insaturados, tendo de uma a seis duplas ligações (NILSSON, 1996; SAHENA et al., 2009a, ACKMAN, 2008). É conhecido que os animais marinhos contêm um alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados. Algumas pesquisas com diferentes tipos de resíduos de camarão demonstraram seu alto conteúdo nesse tipo de ácidos graxos. Este fato motivou o estudo nos resíduos de camarão, que possivelmente é uma importante fonte de lipídeos com alto teor em ácidos graxos ω -3 (SHAHIDI e SYNOWIECKI, 1991; HEU et al., 2003; ACKMAN, 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA, pelas siglas em inglês), são classificados de acordo com a posição das duplas ligações que são contadas a partir da extremidade metila ou carboxila, com a convenção “ ω ” ou “n”. A maioria dos PUFAS de importância biológica pertencem aos grupos ω -6 e ω -3 (SAHENA et al., 2009b). Estes são conhecidos como ácidos graxos essenciais, porque os mamíferos, incluindo os humanos, não podem sintetizá-los e portanto, precisam obtê-los a partir da dieta alimentar. Estes ácidos graxos são originários de fitoplânctons e algas, sendo acumulados pelos peixes e animais marinhos, considerando-se na atualidade a principal fonte deste tipo de ácidos graxos (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006).

São duas as famílias de ácidos graxos poliinsaturados e cada uma delas é representada por um ácido essencial ou precursor: o ácido linoléico (C18:2, família ω -6) e o ácido alfa-linolênico (C18:3, ALA, família ω -3), que por sua vez, é posteriormente insaturado dando origem aos ácidos eicosapentaenóico (EPA), ácido docosaenóico (DHA) e ácido docosapentaenóico (DPA) (SIMOPOULOS, 2003; SAHENA et al., 2009b). As estruturas químicas da família dos ácidos graxos ômega-3 são mostradas na Figura 2.3.

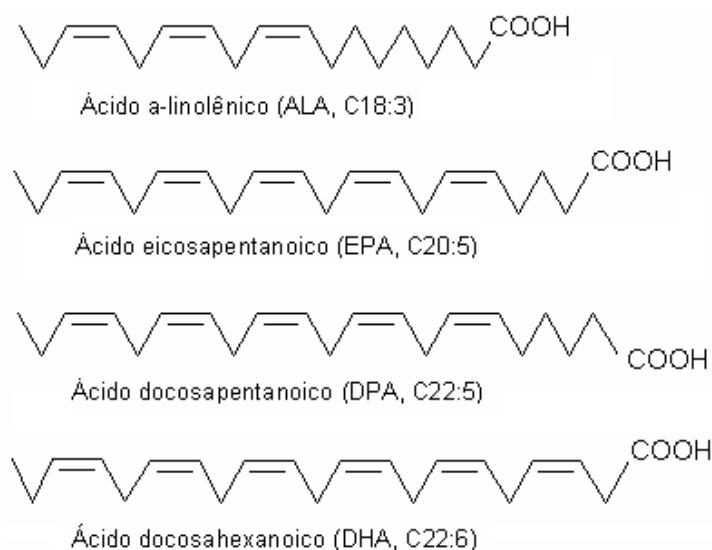


Figura 2.3.- Família dos ácidos graxos ω -3.

(Adaptado de SAHENA et al., 2009b).

Na última década, a importância do consumo balanceado de PUFAS tem sido reconhecida por organizações do mundo todo devido ao aumento de casos de doenças cardiovasculares, obesidade, arteriosclerose e diabetes (SIMOPOULOS, 2003). Atualmente, existe um consenso sobre o consumo destes ácidos graxos o qual deve ser no mínimo 3 % e preferivelmente de 10 % a 20 %, do lipídeo total consumido e uma relação de ácidos graxos saturados a insaturados de 4:1 ou 5:1 (SAHENA et al., 2009b).

Os efeitos benéficos dos ácidos graxos ω -3 são entre outros: (1) redução dos triglicerídeos no plasma sanguíneo; (2) diminuição da viscosidade do sangue; (3) decréscimo da pressão arterial; (4) redução da arteriosclerose; (5) redução da inflamação na artrite, psoríase, asma e (6) diminuição na incidência de tumores (SAHENA et al., 2009b, SIMOPOULOS, 2001, 2003).

As pesquisas acerca do teor de lipídeos na carne de camarão têm sido focalizadas principalmente sobre o teor de colesterol e o perfil total de ácidos

graxos, isto visando conhecer seu valor e importância nutricional. Krzynowek e Panunzio (1989) avaliaram o conteúdo de lipídeos e a composição de ácidos graxos de 11 amostras de carne de camarão proveniente de várias localidades do continente americano. Nove destas espécies corresponderam à espécie *penaeus*, no entanto somente foram reportados resultados de composição de ácidos graxos para cinco destas espécies (Tabela 2.2).

Tabela 2.2.- Teor de lipídeos e conteúdo de EPA e DHA de amostras de carne de camarão da espécie *penaeus*.

Nome vulgar	Espécie de camarão	Conteúdo de lipídeos (%) ^c	Conteúdos ácidos graxos poliinsaturados (%m/m)	
			EPA	DHA
Lousiana Brown ^a	<i>P. aztecus aztecus</i>	0,9	17,2	15,2
Texas Brown ^a	<i>P. aztecus aztecus</i>	0,9	21,7	13,4
Equador White ^a	<i>P. vannamei</i>	1,0	16,2	12,4
Brasil Brown ^a	<i>P. aztecus subtilis</i>	0,8	19,2	9,8
Honduras Pink ^a	<i>P. durarum notialis</i>	0,9	16,6	10,6
Camarão-rosa ^b	<i>P. brasiliensis</i>	1,0	18,7	13,6

^a Krzynowek e Panunzio (1989); ^b Bragagnolo e Rodrigues-Amaya (1997);

^c Resultados expressados em base úmida (b.u.)

Observa-se que o conteúdo de lipídeos é baixo, com valores ao redor de 1 %, embora o conteúdo de ácidos graxos EPA e DHA representa aproximadamente 27-35 % dos ácidos graxos totais. Bragagnolo e Rodrigues-Amaya (1997) reportaram dados semelhantes para a carne de camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis*). Segundo, o Expert Panel On Food Safety And Nutrition (LOVELL, 1991) o músculo do camarão contém menos que 1 % de lipídios totais, já que o maior depósito de gordura está localizado no hepatopâncreas, o qual fica localizado na região do cefalotórax (cabeça).

Ibrahim e colaboradores (1999) no estudo de resíduos do camarão *Penaeus spp.*, encontraram um conteúdo de lipídeos totais no cefalotórax de 10,5 % (b.s) e no exoesqueleto (casca) de 3,78 % (b.s). Para o exoesqueleto e o cefalotórax, os percentuais obtidos de ácidos graxos poliinsaturados foram 48,21 e 35,43 %, respectivamente. Por sua vez, Henriques e colaboradores (2006) reportaram valores de 13 % de lipídeos em cabeças de camarão branco cultivado (*Penaeus vannamei*), contendo em sua composição 9,0 % de EPA e 10,0 % de DHA. Nos estudos feitos por Krzeczowski (1970), obteve-se 1.0 a 4.0 % de lipídios totais no resíduo do camarão *Pandalus borealis* e reportou-se também um conteúdo de ácidos graxos de 18.5 % de EPA e 13,4 % de DHA nos lipídeos do resíduo analisado. Na Tabela 2.3, apresenta-se alguns dados de composição de lipídeos em *resíduos* de outras espécies de camarão, evidenciando-se o alto conteúdo de ácidos graxos ω -3 presentes, o que motiva o estudo de aproveitamento destes resíduos.

Tabela 2.3.- Teor de lipídeos totais e conteúdo de EPA e DHA em resíduos de camarão de diferentes espécies.

Espécie de camarão	País de Origem	Conteúdo de lipídeos (%) ^a	Ácidos graxos poliinsaturados (%m/m)		Referência
			EPA	DHA	
<i>Pandalus borealis</i>	Canadá	2,30	13,16	10,57	Shahidi e Synowiecki, 1991
<i>Penaeus spp.</i>	Egito	7,14	nr	nr	Ibrahim et. al., 1999
<i>Pandalus borealis</i>	Korea	2,87	8,9	10,7	Heu et al., 2003
<i>Trachypena curvirostris</i>	Korea	3,25	10,7	10,9	Heu et.al., 2003
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	Brasil	3,53	13,22	20,50	Holanda, 2004
<i>Penaeus monodon</i>	Bangladesh	2,50	nr	nr	Nargis et al., 2006
<i>Pandalus borealis</i>	Alaska	1,0-4,0	18,5	13,4	Krzeczowski, 1970
<i>Penaeus Brasiliensis</i>	Brasil	0,94	nr	nr	Assunção e Pena, 2007

^a Resultados expressados em base seca (b.s.) ; nr. não reportado

2.4.2 Carotenóides: Astaxantina

A astaxantina (ASX) é o pigmento mais abundante em animais aquáticos como salmão, truta, camarão, lagosta e ovos de peixe, embora também seja encontrada em microalgas, leveduras e nas plumas de algumas aves, como o flamingo. Possui aplicações importantes em alimentos funcionais, rações para crustáceos e salmonídeos na aquicultura e na indústria farmacêutica (SHAHIDI e BROWN, 1998; HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; HUSSEIN et al, 2006).

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) é um carotenóide que pertence a família das xantofilas, são conhecidos assim os carotenóides que possuem um ou mais átomos de oxigênio na sua estrutura (SHAHIDI e BROWN, 1998; HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). A estrutura química da astaxantina é mostrada na Figura 2.4.

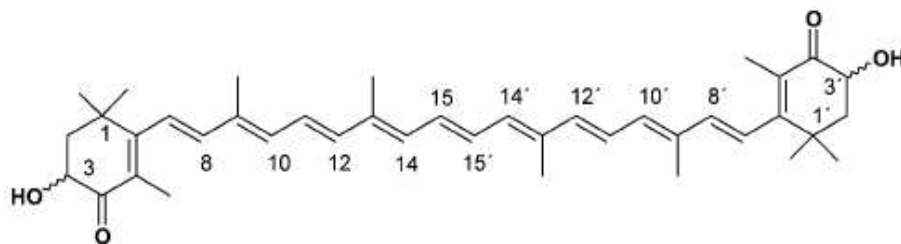


Figura 2.4.-. Estrutura química da Astaxantina.

Fonte: (HUSSEIN et. al., 2006).

A presença do grupo hidroxila (OH) e carbonila (C=O) sobre cada um dos seus anéis de β -ionona explicam algumas características singulares da astaxantina, como por exemplo, a capacidade de ser esterificada, sua alta atividade antioxidante e uma maior natureza polar com relação a outros carotenóides. A astaxantina em sua forma livre é considerada como instável e muito susceptível à oxidação (HUSSEIN et. al., 2006). Cada ligação dupla da cadeia pode existir em duas configurações como isômeros geométricos *cis* (Z) e *trans* (E). Os isômeros *cis* são termodinamicamente mais instáveis do que os

isômeros *trans*, e a maioria dos carotenóides em forma natural e sintética são encontrados nesta última forma. Além de formar isômeros geométricos e considerando que cada molécula tem dois centros quirais em C-3S e C-3'S, a astaxantina pode apresentar três isômeros configuracionais: dois enantiômeros (3R, 3'R e 3S, 3'S) e uma forma meso (3R,3'S) (Figura 2.5). As configurações mais abundantes na astaxantina natural são a 3S,3'S ou 3R, 3'R (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; HUSSEIN et. al., 2006). Dependendo da sua origem (natural), a astaxantina pode-se encontrar livre ou conjugada com outros compostos como proteínas, lipoproteínas e esterificada com um ou dois ácidos graxos, os quais estabilizam a molécula (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; HUSSEIN et. al., 2006).

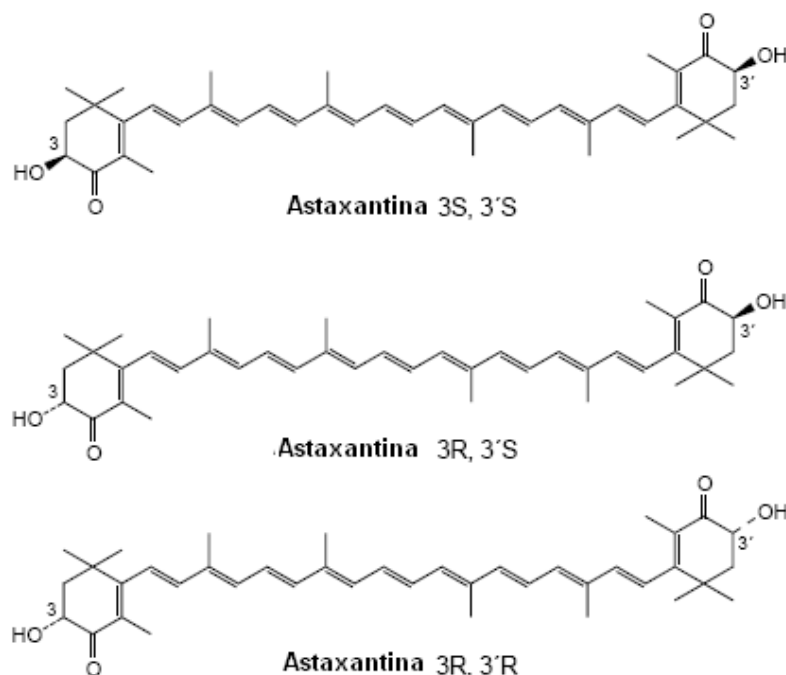


Figura 2.5. - Isômeros configuracionais da Astaxantina.

(Adaptado de: GUERIN et. al., 2003).

Os complexos de carotenoproteínas proporcionam uma coloração marrom-azulado e quando estes compostos são desnaturados pelo calor, a ASX é exposta e desenvolve a cor laranja-avermelhada típica, indicando a presença de

astaxantina livre (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). Estudos reportam que nos resíduos de camarão *Pandalus borealis*, predomina a forma esterificada, principalmente como diester (SHAHIDI e SYNOWIECKI, 1991).

O mercado mundial dos carotenóides foi estimado em U\$ 887 milhões em 2004, onde a astaxantina foi a responsável por 28 % da venda de carotenóides (LIMA, 2008). As rotas de produção deste carotenóide são: síntese química, produção biotecnológica (leveduras e microalgas) e extração de crustáceos (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; HUSSEIN et. al., 2006; LIMA, 2008). A demanda comercial atual de astaxantina é principalmente satisfeita pela síntese química. A astaxantina sintética é atualmente produzida através de complexas reações químicas pelas empresas Hoffmann-La Roche AG e BASF. Esta molécula “sintética” é idêntica à produzida por organismos vivos, e consiste em uma mistura racêmica de 1: 2: 1 dos isômeros (3S, 3S’), (3R, 3S’), e (3R, 3’R) respectivamente (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). A astaxantina é vendida por aprox. US\$2.500/kg, o que representa um aumento de 10 a 20 % do custo total da produção de carne de peixe (LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

2.4.2.1 Fontes naturais de astaxantina

Embora mais de 95 % do consumo de astaxantina na aquicultura é fornecido pela rota sintética, um crescimento na demanda de alimentos naturais e os altos custos dos pigmentos sintéticos têm estimulado a pesquisa de fontes naturais de astaxantina com potencial para sua industrialização (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; LORENZ e CYSEWSKI, 2000). A concentração deste antioxidante nas principais fontes naturais mostra-se na Tabela 2.4.

Tabela 2.4.- Principais fontes naturais de Astaxantina.

Fontes	Concentração de Astaxantina (ppm) aprox.
Salmão	5
Krill (<i>Euphasia pacifica</i>)	120
Camarão do ártico (<i>Pandalus borealis</i>)	1200
<i>Phaffia rhodozyma</i> (levedura)	8000
<i>Hematococcus pluvialis</i> (microalga)	40000

Fonte: ALGATECHNOLOGIES LTD, 2004.

- **Algas**

Numerosas pesquisas foram realizadas para avaliar vários fatores e condições que afetam o crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis*, a fonte natural mais rica em astaxantina (ALGATECHNOLOGIES LTD, 2004; LORENZ e CYSEWSKI, 2000; MACHMUDAH et al., 2006). O sistema de produção consiste no cultivo da microalga em grandes lagoas em condições controladas, seguido do procedimento para quebrar a sua parede celular e aumentar a biodisponibilidade dos carotenóides. Finalmente, a biomassa é seca, obtendo-se produtos com concentrações entre 1,5 e 2,0 % de ASX, sendo utilizadas como pigmentos e nutrientes para animais aquáticos e também na indústria avícola para a pigmentação de frangos e ovos (gema) (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). Outras espécies de algas como *Chlorella vulgaris* também tem sido propostas como fontes de ASX (MENDES et al., 1995), apresentando-se eficiente na pigmentação de peixes, com a mesma magnitude dos pigmentos sintéticos (GOUVEIA et al., 2002).

- **Levedura**

Nas últimas duas décadas, a levedura *Phaffia rhodozyma* ou *Xanthophyllomyces dendrorhous* tem sido amplamente estudada devido a sua

capacidade para a produção de astaxantina (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006; LIMA, 2008). A ASX é produzida por fermentação em um meio controlado de forma efetiva, obtendo um produto com um alto percentual de ASX livre (8.000 µg/g). Atualmente, a levedura é comercializada em um pó fino como uma fonte natural de ASX, proteínas e outros nutrientes e utilizados como ingrediente na alimentação dos salmonídeos (IGENE, 2007).

- **Subprodutos de crustáceos**

A função principal da astaxantina está focalizada na aquicultura, como fonte de pigmento no cultivo de salmão, truta e crustáceos em cativeiro (LIMA, 2008; SHAHIDI e BROWN, 1998). Segundo Simpson (2006), não há contradição no fato de que o setor de rações para a aquicultura se represente como usuário principal de pigmentos naturais a partir de resíduos de crustáceos. Este fato poderá ser verdadeiro no futuro, dado o aumento constante na liderança de países como a Noruega e Chile, no cultivo de salmão e truta.

Salmonídeos, crustáceos e outros animais, apresentam uma exigência da presença de pigmentos carotenóides para cumprir e melhorar diversas funções biológicas, incluindo a atividade pró-vitamina A (efeito antioxidante), como precursores de hormônios, na resposta imune, e no crescimento, maturação e reprodução (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). No entanto, devido aos animais serem incapazes de realizar a síntese “*de novo*” de pigmentos carotenóides, estes compostos devem ser incluídos na suas dietas para realizar as diferentes funções mencionadas acima. Microorganismos e plantas inicialmente sintetizam compostos carotenóides como o licopeno, β-caroteno e cantaxantinas a partir de piruvato e Acetil Coenzima A na via dos isoprenóides (LORENZ e CYSEWSKI, 2000). Os carotenóides são posteriormente ingeridos na sua dieta a partir destas fontes primárias e são convertidos enzimaticamente para outros carotenóides como a astaxantina. Em alguns peixes e crustáceos, as deficiências em

carotenóides levam a defeitos indesejáveis como a síndrome de cor azul em camarões. A estratégia que têm sido utilizada para evitar esses efeitos e dar a cor laranja brilhante desejada é a inclusão de astaxantina sintética (NatuRoseTM ou Carophyll[®]) nas rações da criação de crustáceos e animais marinhos (SIMPSON, 2006).

Os carotenóides contidos em subprodutos do beneficiamento do camarão têm sido profundamente estudados e quantificados. Tais pesquisas abordam vários tipos de extração: Shahidi e Synowiecki (1991) e Saito e Regier (1971) utilizaram o resíduo de camarão *Pandalus borealis* para extração de astaxantina utilizando óleo de fígado de bacalhau como solvente. Por outro lado, Meyers e Bligh (1981) utilizaram a extração com solventes orgânicos (éter de petróleo – acetona – água (15: 75: 10 v/v/v)) para a extração de carotenóides a partir de exoesqueleto de lagosta obtendo ótimos resultados. Chen e Meyers (1982) encontraram 161,5 µg de astaxantina /g de resíduos de lagostim, usando solvente, contra 80 µg de astaxantina /g, na extração com óleo. Yamaguchi et al. (1986), utilizaram CO₂ supercrítico como solvente para extrair óleo e astaxantina de krill da Antártica, *Euphausia superba* (um crustáceo semelhante ao camarão). Eles reportaram valores muito superiores aos alcançados por Shahidi e Synowiecki (1991) e Chen e Meyers (1982). Na Tabela 2.5, é apresentado com mais detalhes as pesquisas mencionadas.

Tabela 2.5.- Alguns estudos realizados da extração de astaxantina a partir de crustáceos

Fonte	Carotenóides Totais (µg ASX/g resíduo)	Solvente de extração	Astaxantina (%)			Outros Carotenóides	Referencia
			Livre	Monoester	Diester		
Camarão ^a (<i>P. borealis</i>)	147,7	Óleo de fígado de bacalhau	3,95	19,72	74,29	Zeaxantina	Shahidi e Synowiecki (1991)
Camarão ^a (<i>Solenocera melanthera</i>)	121,3	Óleo de fígado de bacalhau	nr	nr	nr	--	Saito e Regier (1971)
Lagosta ^a (<i>Procambarus clarkii</i>)	153,1	Solventes orgânicos	40,3	49,4*	nr	Astaceno	Meyers e Bligh (1981)
Camarão (<i>Penaeus indicus</i>)	40,6	Solventes orgânicos (Acetona)	nr	nr	nr	--	Sachindra et al., (2005)
Lagostim-vermelho ^a (<i>Procambarus clarkii</i>)	161,5	Solventes orgânicos	nr	nr	nr	--	Chen e Meyers (1982)
	87,8	Óleo de soja					
Lagostim-vermelho ^a (<i>Procambarus clarkii</i>)	177,5	Solventes orgânicos (Acetona)	nr	nr	nr	--	Charest et al. (2001)

^a Dados reportados em base seca (b.s.)

* Reportados como ésteres de astaxantina totais

nr não reportados

2.4.2.2 Astaxantina como antioxidante

O metabolismo dos organismos aeróbicos gera normalmente moléculas oxidativas, isto é, radicais livres (moléculas com elétrons desemparelhados) tais como hidroxilas e peróxidos, bem como espécies reativas de oxigênio, que são necessários para sustentar os processos vitais. No entanto, quantidades em excesso deste tipos de compostos são perigosos devido a sua alta reatividade, pois eles podem se ligar com vários componentes celulares tais como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA (DI MASCO et al., 1991; HIGUERA-CIAPARA et al., 2006). Assim, um antioxidante é uma molécula que tem a capacidade de remover radicais livres de um sistema, reagindo com eles para produzir outros compostos

inócuos ou interromper as reações de oxidação (DI MASCO et al., 1991; MOURE et al., 2001).

Os efeitos potenciais da astaxantina sobre a saúde humana têm sido associados com suas propriedades antioxidantes (NAGUIB, 2000). Além de ser um pigmento, a astaxantina é um potente antioxidante, sendo este seu segundo uso mais importante (LIMA, 2008). Tem sido reportado que a ASX tem uma atividade antioxidante 10 vezes maior que outros carotenóides como zeaxantina, luteína, cantaxantina e β -caroteno (MIKI, 1991). Vários estudos médicos realizados nos últimos 10 anos, tem sido compilados em dois trabalhos de revisão (GUERIN et al., 2003; LORENZ e CYSEWSKI, 2000), os quais descrevem os benefícios de um alto consumo de astaxantina. Como os crustáceos, os mamíferos incluindo os seres humanos, carecem da capacidade de sintetizar astaxantina ou convertê-la em vitamina A, por isso é necessário que seja adicionada na dieta alimentar (HUSSEIN et al., 2006; GUERIN et al., 2003; HIGUERA-CIAPARA et al., 2006).

Algumas doenças e condições de saúde para a qual a ASX tem mostrado efeitos benéficos são listadas abaixo (GUERIN et al., 2003; HIGUERA-CIAPARA et al., 2006).

- Doenças cardiovasculares;
- Cataratas;
- Doenças de Alzheimer e de Parkinson;
- Inflamação crônica, doenças virais e auto-imunes;
- Normalização do ritmo cardíaco;
- Proteção solar contra os raios UV;
- Agente anti-hipertensão;
- Colesterol;
- Dispepsia;

- Hiperplasia benigna da próstata (HBP).

2.5 Extração de lipídeos e carotenóides com solventes orgânicos

A extração com solventes é o método mais comumente usado na extração de lipídeos. Algumas desvantagens com relação à separação do solvente do lipídeo como as altas temperaturas de processo e a grande quantidade de solvente necessário para conseguir altos rendimentos, têm direcionado a pesquisa de novas metodologias para a extração destes compostos (SAHENA et al., 2009a). Em geral, os carotenóides e lipídeos são compostos solúveis em solventes não-polares, pelo qual este tipo de solventes tem sido utilizado para realizar a sua extração. No entanto, quando as amostras que contém os carotenóides possuem uma umidade considerável, estes precisam ser extraídos usando um solvente polar como modificador (por exemplo, etanol ou acetona) (MERCADANTE, 2008; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenóides são alcenos, (com várias duplas ligações) os quais apresentam susceptibilidade a reações químicas típicas deste grupo químico, como por exemplo, oxidação e halogenação. Por isto, os solventes utilizados para extração de carotenóides devem estar livres de oxigênio, ácidos, halógenos, com o fim de evitar a sua degradação. A seleção de um solvente é muito importante para obter extratos de boa qualidade e, além disso, deve ser não inflamável, não tóxico e não volátil. No entanto, até hoje, não tem se encontrado um solvente com tais características. Alguns solventes como os clorados apresentam um rendimento alto de extração, mas são potencialmente tóxicos e cancerígenos (DELGADO - VARGAS et al., 2000; MERCADANTE, 2008). Outros solventes como o n-hexano e n-heptano, apresentam baixas taxas de extração, porém o restante das suas características são favoráveis, de fato é empregado a nível industrial para extrair carotenóides com a mesma metodologia utilizada para a extração de óleo. Uma grande preocupação pelo meio ambiente e pelos baixos

rendimentos de extração deixados por estes solventes (quase 50 % dos carotenóides são perdidos), tem-se direcionado os estudos para alternativas de extração. Uma alternativa de processo hoje em dia, é a extração com fluidos supercríticos, em razão deste processo apresentar-se rápido, eficiente e de baixa toxicidade (DELGADO - VARGAS e PAREDES - LÓPEZ, 2003)

2.6 Extração com fluidos supercríticos

2.6.1 Fluido Supercrítico (SCF)

Uma substância está no estado supercrítico quando sua temperatura e pressão são superiores aos seus valores críticos (T_c e P_c , respectivamente). (SANDLER, 1989). Na Figura 2.6 são observadas as regiões onde sólido, líquido, gás (vapor), líquido-vapor, sólido-líquido e fluido supercrítico existem.

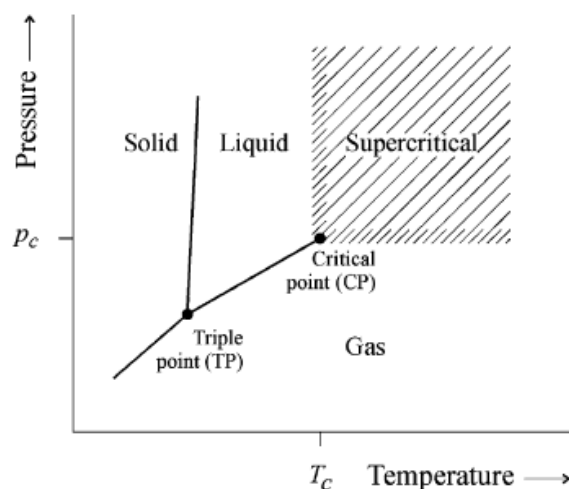


Figura 2.6.- Diagrama de Equilíbrio para uma substância pura.
Fonte: (Brunner, 2005).

No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas das substâncias assumem valores intermediários entre as dos líquido e gas. Propriedades como a densidade, relacionadas à capacidade de solubilização, aproximam-se daquelas típicas de um líquido, enquanto que as propriedades relacionadas ao transporte de

matéria, como a difusividade e a viscosidade, alcançam valores típicos aos de um gás (CLIFFORD, 1999). Adicionalmente, perto do ponto crítico, sua densidade pode mudar rapidamente, variando os valores de temperatura e pressão, permitindo ter seletividade ou fracionamento no extrato (BRUNNER, 2005).

É bem conhecido que os gases são péssimos solventes, mas se difundem com extrema facilidade e são pouco viscosos. Por outro lado, os líquidos são excelentes solventes, mas de difusão lenta e alta viscosidade. Assim, os fluidos supercríticos são convenientes substitutos dos solventes orgânicos nos processos de extração. Relaciona-se a seguir algumas das suas propriedades e vantagens da sua utilização (ROZZI e SINGH, 2002):

1. Possuem alto coeficiente de difusão e viscosidade baixa;
2. Ausência de tensão superficial, o qual aumenta a operação de extração dado a rápida penetração destes no interior dos poros da matriz heterogênea;
3. A seletividade durante a extração pode ser manipulada pela variação das diferentes condições de operação, como temperatura e pressão afetando a solubilidade de vários componentes no fluido supercrítico;
4. Não deixa resíduos químicos no extrato de interesse;
5. Permite sua fácil recuperação, admitindo processos de recirculação.

2.6.2 Processo de extração com fluidos supercríticos

A extração com fluido supercrítico (SFE) é uma operação unitária utilizada principalmente quando se deseja retirar substâncias de interesse (analitos) de matrizes sólidas e que aproveita o poder solvente dos SCF (BRUNNER, 2005; DEL VALLE e AGUILERA, 1999).

Esta técnica consiste em duas etapas: extração e separação do extrato do solvente: na extração, o fluido supercrítico escoar através de um leito fixo de

partículas sólidas e solubiliza os compostos da matriz sólida. O solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. A mistura extrato/solvente deixa o extrator e passa pelo separador (precipitador), onde finalmente os compostos são separados através da alteração das condições de pressão e temperatura de modo que o solvente seja gasoso nessas condições (BRUNNER, 2005).

Algumas características deste tipo de extração foram relatadas por Brunner (2005):

- O material sólido é esgotado do material extraído no sentido do fluxo do solvente;
- A forma da curva de extração (massa de soluto extraído *versus* massa de solvente) depende das propriedades cinéticas de extração do material sólido e do poder solvente do SCF, o qual, pela sua vez, depende das condições de operação (pressão e temperatura);
- Tanto para a matriz sólida como para o solvente, o processo é transiente.

A extração de compostos de fontes naturais é a aplicação mais estudada dos SCF. A extração com fluidos supercríticos apresenta vantagens sobre os processos tradicionais de extração (principalmente extração com solventes): é um processo flexível devido à possibilidade de ajustar continuamente o poder solvente/seletividade do SCF, permitindo a supressão dos solventes orgânicos (poluidores) e o custoso processo de eliminação do solvente do extrato (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (SC-CO₂), pois não é corrosivo na presença de água, não é tóxico, não inflamável, não reagente e pode-se obtê-lo a partir de recursos renováveis em grandes quantidades, com alta pureza e a baixo custo (DEL VALLE e AGUILERA, 1999). Além disso, suas temperatura e pressão críticas são baixas (T_c = 31 °C, P_c=73, 86 bar) o que é

conveniente quando se pretende extrair compostos termoláveis (CLIFFORD, 1999). O CO₂ possui uma baixa polaridade, o que o permite extrair seletivamente compostos com estruturas químicas similares aos que são extraídos com solventes orgânicos convencionais, como n-pentano e n-hexano (DEL VALLE e AGUILERA, 1999; REVERCHON e DE MARCO, 2006). Segundo Del Valle e Aguilera (1999) o poder solvente do SC-CO₂, pode ser resumido pelas seguintes características:

- A presença de moléculas polares e o aumento da massa molecular geralmente diminuem a sua solubilidade;
- Compostos orgânicos oxigenados (alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres) de mediana massa molecular ≤ 150 Da), compostos orgânicos não polares (alcanos, alcenos, terpenos) de baixa massa molecular e compostos orgânicos polares (ácidos carboxílicos) de baixa massa molecular são solúveis;
- Ácidos graxos livres e seus glicerídeos têm baixa solubilidade e a água é poquíssimo solúvel;
- O SC-CO₂ é um solvente muito flexível devido às grandes variações nas suas propriedades, ainda que não é um solvente universal. Na medida em que a pressão aumenta, o SC-CO₂ é capaz de separar compostos menos voláteis, de maior massa molecular e/ou maior polaridade dentre aqueles não-polares tais como (em ordem de capacidade de extração decrescente): óleos essenciais, terpenos mais pesados, ésteres, ácidos graxos livres, óleos, ceras, resinas e pigmentos (clorofila, carotenos). As proteínas, amidos, açúcares e sais minerais são insolúveis.

São inúmeras as aplicações da extração supercrítica, como exemplos: descafeinação de café e chá, extração de aromas, antioxidantes e outras substâncias ativas de várias partes das plantas (alecrim, coentro, tomilho, orégano, murta, erva cidreira, etc.), extração de corantes naturais (licopeno, β -

caroteno, astaxantina), eliminação de óleo de batatas, desodorização de óleos e de gorduras animais e vegetais e remoção de pesticidas, entre outros (BRUNNER, 2005; REVERCHON e DE MARCO, 2006)

2.6.3 Taxa de extração supercrítica: transferência de massa

O curso da extração supercrítica a partir de substratos sólidos apresenta dois tipos de curvas de taxa de extração. A curva (a) da Figura 2.7, representa o caso de uma extração com alta quantidade de concentração inicial de extrato no substrato sólido ou o caso de um extrato que é facilmente acessível ao solvente.

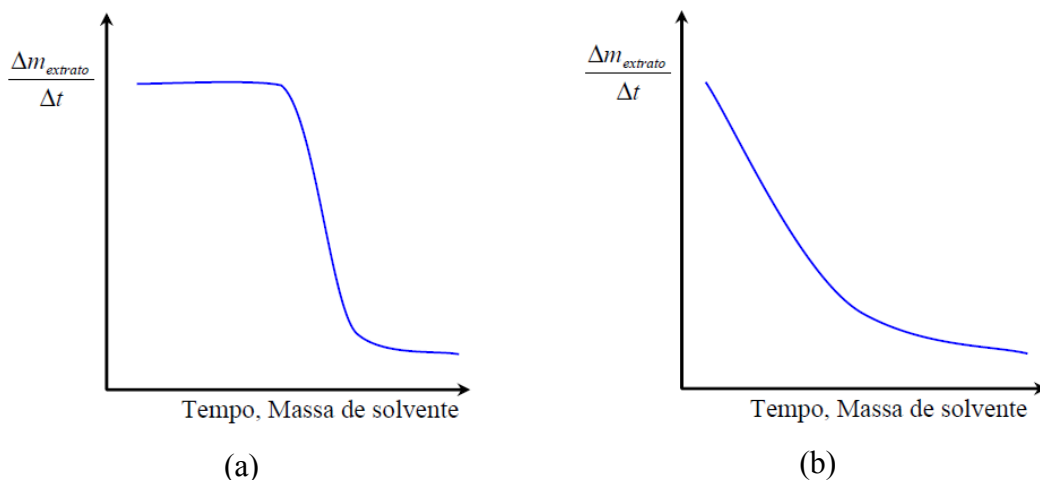


Figura 2.7.- Esquemas típicos das curvas globais de extração (OEC).

(Brunner, 1994 adaptado de Quispe-Condori. 2005).

Durante a primeira parte da extração (CER, *constant extraction rate period*), a transferência de massa é constante e determinada pela transição na interface entre o sólido e o solvente. Na segunda parte deste tipo de extração (FER, *falling extraction rate period*), dois efeitos podem causar uma queda na concentração média do extrato no solvente: (1) O extrato no substrato sólido perto da interface sólido/gás é esgotado, e, portanto o transporte do extrato do interior do substrato para a superfície representa uma resistência adicional à transferência de massa, e

(2) o comprimento do leito que contém o extrato não é suficiente para que o solvente seja saturado (MEIRELES, 2008).

A curva (b) representa a taxa de extração em casos onde a concentração inicial de extrato no substrato sólida é baixa, ou o solvente não tem fácil acesso, de modo que o transporte do composto de interesse desde o sólido até a interface substrato/solvente é dominado pela transferência de massa desde o começo da extração (BRUNNER, 1994). O coeficiente de transferência de massa é uma função dos parâmetros de processo e das características do leito. Se as características do leito (tamanho das partículas e densidade do leito) forem mantidas constantes, espera-se que os parâmetros de processo (temperatura, pressão e vazão de CO₂) exerçam influência sobre o coeficiente de transferência de massa (BRUNNER, 1994).

2.6.4 Extração com fluidos supercríticos usando etanol como co-solvente

É possível modificar e estender a seletividade e solubilidade de certos compostos em dióxido de carbono supercrítico pela adição de co-solventes no meio de extração (BRUNNER, 1994; RAVENTÓS et al., 2002). Este fato pode ser explicado pelas interações físicas entre solvente e co-solvente (pelo incremento de densidade), bem como as interações químicas com o soluto de interesse (por ligações de hidrogênio). Tem-se demonstrado que o uso de co-solvente facilita a solubilidade em dióxido de carbono de materiais como lipídeos de gema de ovo, óleo de peixe, pigmentos a partir de cenoura e tomate e vários antioxidantes (RAVENTÓS et al., 2002). Para a maioria das aplicações industriais, a seleção de solventes é geralmente limitada a solventes considerados como seguros (GRAS), e, na prática, o etanol, ou misturas de etanol com água são utilizados (BRUNNER, 1994)

Na extração supercrítica de lipídeos e colesterol a partir de carne moída de boi (CHAO, 1996) mostrou-se que nas condições de 138 bar e 40°C, a adição de 5%(m/m) de etanol como co-solvente resultou em um aumento de 3.6 vezes no rendimento de extração de lipídeo com relação à extração realizada com CO₂.

2.7 Extração supercrítica de lipídeos e astaxantina com fluidos supercríticos

2.7.1 Extração de lipídeos

A extração de lipídeos com fluidos supercríticos tem ganho uma grande aceitação como uma técnica limpa de extração e uma alternativa à tradicional feita com solvente. Das características referidas da extração supercrítica cabe ressaltar que lipídeos polares como fosfolipídios e glicolipídeos (Figura 2.2) permaneceram sem ser extraídos devido a sua baixa solubilidade em SC-CO₂. Também, é importante mencionar a alta pureza do extrato, o qual após a extração encontra-se livre de solvente orgânico. Na Tabela 2.6 são apresentadas as principais vantagens do uso de fluidos supercríticos na extração de lipídeos em relação à extração com solventes orgânicos.

Muitos autores têm estudado a influência do teor de água na matéria-prima no rendimento da extração supercrítica de óleos. Dunford et al. (1997) estudaram a extração do óleo da cavala do atlântico com diferentes teores de água e concluíram que a solubilidade do óleo no fluido supercrítico diminui com o aumento do nível de umidade do peixe. King et al. (1989) sugeriram que a desidratação de carne bovina de 74% para 1,5% de umidade, permitiria um melhor contato entre a SC-CO₂ e a fase lipídica nas amostras de carne.

Tabela 2.6.- Comparação entre a extração de lipídeos por solventes e fluidos supercríticos.

Extração com solvente	Extração supercrítica sem co-solvente
• Presença inevitável de solvente. O nível residual do solvente (geralmente ppm) depende do tipo de solvente usado; • Conteúdo de metais pesados também é inevitável e dependem do solvente usado, a metodologia de reciclo do solvente e o material de construção dos equipamentos empregados; • Sais inorgânicos não podem ser evitados, usando o mesmo conceito acima; • Substâncias polares são dissolvidas juntamente com as substâncias lipofílicas devido a pouca seletividade do solvente. Durante a remoção do solvente, os compostos polares formam polímeros que levam a descoloração do extrato e adquirem pobres características de escoamento, obtendo-se um extrato “pseudonatural”; • Substâncias polares e não polares são extraídas; • Remoção do solvente exige operações unitárias adicionais, resultando em maior custo do processo e menor recuperação de material útil;	• Extrato totalmente livre de solventes e, portanto mais puro; • Totalmente livre de metais pesados já que eles não são extraíveis ainda que eles estejam presentes na amostra a ser extraída. Nenhum metal pesado se encontra presente no CO₂; • Totalmente livre de sais inorgânicos, explicado pelas mesmas razões acima; • O CO₂ é altamente seletivo e não existe a possibilidade de substâncias polares formarem polímeros. Além disso, temperaturas entre 40-80 °C são empregadas; • Somente compostos não polares e ligeiramente polares são extraídos; • Nenhum equipamento adicional é necessário e a recuperação de material puro é muito alta.

(Adaptado de SAHENA et al., 2009a)

Poucos artigos da literatura têm descrito a extração de lipídeos de origem animal ou de seus componentes com dióxido de carbono supercrítico. Estudos têm sido principalmente focados na extração de lipídeos a partir de peixes, crustáceos e ovos (HARDARDOTTIR e KINSELLA, 1988; YAMAGUCHI et al., 1986; FRONING et al., 1990). O interesse principal destas pesquisas foi estudar o perfil de ácidos graxos, devido ao fato de que os animais marinhos contém uma quantidade importante de glicerídeos com ácidos graxos poliinsaturados presentes na sua estrutura.

Charest et al. (2001) reportaram um “screening” (classificação) dos efeitos da temperatura, pressão, uso de co-solvente, tamanho de partícula e cozimento dos resíduos sobre o rendimento de extração de óleo de resíduos de lagostim-vermelho (*Procambarus clarkii*). Foi observado que variáveis como temperatura, pressão, cozimento dos resíduos e o tamanho de partícula não apresentaram nenhum efeito, enquanto que o uso de co-solvente e pouca umidade apresentaram efeitos positivos.

Yamaguchi et al (1986) analisaram os efeitos da temperatura e da pressão na extração de óleo de krill da Antártica com SC-CO₂ (*Euphausia superba*) que é um crustáceo semelhante ao camarão. Quando a temperatura foi aumentada de 40 a 80°C, mantendo a pressão constante (245,2 bar), os rendimentos de extração de lipídeos foram quase constantes. Hardardottir e Kinsella (1988) fizeram similares observações na pesquisa sobre extração de lipídeos e colesterol a partir de truta arco-íris na faixa de pressão de 138-345 bar e temperatura de 40-50°C. No entanto, a adição de 10% de etanol como solvente modificador aumentou significativamente a solubilidade dos lipídeos em SC-CO₂. Tanaka et al. (2004) realizaram a extração supercrítica de lipídeos a partir de ovas de salmão e quando foi adicionado 5% de etanol na mistura do solvente de extração, aproximadamente 80% dos triacilgliceróis foram recuperados. Já, as extrações realizadas com misturas de 10, 15 e 20% de etanol atingiram recuperações acima de 90%, como

pode ser observado na Tabela 2.7, a qual apresenta alguns exemplos de condições experimentais usadas na extração de lipídeos e astaxantina com SC-CO₂.

No trabalho de Sánchez-Vicente et al. (2009) foi estudado o efeito da pressão e temperatura (40 e 51°C e 150 e 198 bar) na extração de óleo de sementes de pêssago (*Prunus pérsica*). O uso de 2,5 e 5,0 mol % de etanol como co-solvente também foi pesquisado. A extração do óleo desta semente apresenta importância devido a seu alto conteúdo em ácido linoléico (16-18 %). Os resultados mostraram que para uma dada pressão e vazão de CO₂, o rendimento de extração de óleo diminui com o aumento da temperatura. Isto é devido ao efeito da diminuição da densidade do CO₂ que predomina sobre o efeito do aumento da pressão de vapor do soluto para pressões abaixo de 200 bar. O aumento na concentração de etanol provoca um aumento no rendimento de extração de óleo como resultado das interações entre o grupo álcool e os componentes do óleo como ácidos graxos e glicerídeos, o que facilita a sua solubilidade no meio de extração. Foi atingido 70 % do valor dos lipídeos extraídos por soxhlet nas condições de 51 °C, 198 bar e 5 % etanol.

Tabela 2.7.- Alguns estudos de extração supercrítica de lipídeos e astaxantina.

Fonte	Pré- tratamento	Umidade amostra (%)	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Co- solvente % (v/v)	Melhores condições de extração		Referência
						Lipídeos	Astaxantina	
Lagostim-vermelho (<i>Procambarus clarkii</i>)	Liofilização Moagem Peneiragem	0, 25, 50	138 -310	50-70	10	nr	50 °C / 224 bar / 51.15% (umidade)	Charest et al., (2001)
Krill (<i>Euphausia superba</i>)	Liofilização	7.83	245 e 392	40-80	--	40 °C / 250 bar	---	Yamaguchi et al., (1986)
Truta arcoiris (<i>Salmo gairdneri</i>)	Liofilização	< 2	138-345	40-50	10	40 °C /275,8 bar / 10% etanol	nr	Hardardottir e Kinsella, (1988)
Levedura <i>Phaffia rhodozyma</i>	Spray Drying Moagem	nr	102 - 500	40-80	1-15	--	40°C / 500 bar	Lim et al., (2002)
Microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	Liofilização Esmagado	nr	200 - 350	40-55	--	55 °C / 350 bar	55°C / 350 bar	Mendes et al., (1995)
Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	Secagem	nr	200 - 550	40-80	1,67 – 7,5	--	80°C/ 500 bar	Machmudah et al., (2006)
Ovas de salmão	Liofilização	nr	98 – 314	40-80	--	80 °C/ 314bar	80°C/ 314 bar	Tanaka e Ohkubo, (2003)
Resíduos de lagosta	Secagem a temperatura ambiente, Moagem	nr	200-350	40-60	5, 10, 15	--	60°C /250 bar/ 15% etanol	Lopez et al., (2004)
Ovas de salmão	Liofilização	nr	177	40-80	5, 10, 15, 20	33° C/177bar/ 20% etanol	---	Tanaka et al., (2004)

nr: não reportado

2.7.2 Extração de carotenóides

Como mencionado antes, os carotenóides são compostos instáveis e muito sensíveis aos processos de oxidação, onde fatores como luz e altas temperaturas aceleram seus processos de degradação. O tradicional emprego de solventes orgânicos para a extração de carotenóides implica o uso de temperaturas relativamente altas para a remoção dos mesmos e conseqüentemente uma diminuição na quantidade e qualidade dos carotenóides extraídos (MATTEA et al., 2009). Para evitar estes efeitos, o processo de extração com fluidos supercríticos resulta uma metodologia apropriada, pois esta técnica é desenvolvida em uma atmosfera quase inerte e a temperaturas baixas (que podem ser selecionadas), evitando assim a degradação dos compostos de interesse presentes no extrato e transformações aos seus *cis*- isômeros (MATTEA et al., 2009). Pelas anteriores considerações, a extração de xantofilas de fontes vegetais tem sido amplamente estudada, particularmente de microalgas e leveduras (MACÍAS-SÁNCHEZ et al., 2005; CARERI et al., 2001; MENDES et al., 1995

Lim et al., (2002) estudaram a influência da pressão, temperatura, uso de etanol como co-solvente e da vazão de CO₂ na extração supercrítica de carotenóides, astaxantina e lipídeos da levedura *Phaffia rhodozyma*. As condições operacionais foram: 102 - 500 bar, temperaturas de 40 – 80 °C, porcentagem de etanol adicionado de 1-15 % e 3 horas de extração. Os resultados mostraram que o rendimento de extração de carotenóides (incluindo a astaxantina) incrementa gradualmente até 200 bar, com temperaturas de operação de 40, 50 e 60 °C. Acima de 200 bar, o rendimento de extração de carotenóides aumenta drasticamente, obtendo-se o mais alto rendimento de extração de astaxantina e carotenóides (90 % e 84 % respectivamente) nas condições de 500 bar, 40°C e uma densidade de CO₂ de 1,0 kg/m³. O rendimento total de astaxantina incrementa ligeiramente com o incremento da vazão de CO₂, efeito contrário às extrações feitas com co-solvente, onde um aumento na quantidade de etanol

aumentou de maneira significativa a extração de carotenóides. Estes pesquisadores também experimentaram a extração fracionada, desenvolvida em duas etapas consecutivas de extração a 300 e 500 bar, reportando um incremento de 10 vezes na concentração da astaxantina no extrato na segunda etapa. Na primeira etapa foram extraídos os compostos indesejáveis devido à condição de baixa pressão, na qual, a astaxantina tem uma baixa solubilidade no SCF.

Mendes et.al., (1995) extraíram carotenóides (astaxantina e cantaxantina, principalmente) e lipídeos a partir da microalga *Chlorella vulgaris* com SC-CO₂. Para a extração utilizaram as seguintes condições: temperatura (40 – 55 °C), pressão (200 – 350 bar), vazão de CO₂ (0,4 L /min) e tempo de extração de 4h. A pesquisa indicou que o rendimento de extração de lipídeos cresce com a pressão a temperatura constante ou com a temperatura a pressão constante. A extração de lipídeos também está influenciada pelo tamanho de partícula da alga, demonstrando que o maior rendimento de extração de lipídeos (13,3 % (b.s.)) foi encontrado quando a alga foi triturada em comparação quando se fez extração com alga inteira (5% (b.s.)). As curvas de extração de carotenóides mostraram que a temperatura constante, o rendimento incrementa com a pressão. O efeito da temperatura não é muito importante no intervalo de pressões estudado, exceto em 200 bar, onde um incremento na temperatura fez decrescer o rendimento de extração de carotenóides. A 350 bar de pressão, o rendimento de extração supercrítica dos carotenóides com algas trituradas apresentou um valor mais favorável comparado com as extrações feitas com acetona e n-hexano.

Machmudah et al., (2006) avaliaram os efeitos da temperatura, pressão e vazão de solvente no rendimento de extração de astaxantina da microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando SC-CO₂ com e sem etanol como co-solvente. As extrações feitas sem co-solvente demonstraram que a quantidade total de extrato, de astaxantina extraída e o conteúdo de astaxantina no extrato geralmente aumentam com o incremento da temperatura e da pressão. A maior

quantidade de astaxantina extraída foi obtida a 550 bar, 70°C e 3 mL/min de vazão de CO₂. Já nas extrações feitas com co-solvente, a quantidade de astaxantina extraída aumentou mais de duas vezes a uma pressão de 400 bar. Além disso, a maior quantidade de astaxantina foi extraída conforme a razão de etanol no solvente aumentava e a vazão de CO₂ era diminuída.

Lopez et. al. (2004) estudaram a influência da pressão e da temperatura na extração seletiva de astaxantina a partir de lagosta seca e moída usando SC-CO₂. As condições utilizadas na extração foram: temperatura, 40-60 °C, pressão, 200 – 350 bar, vazão de 1-3 mL/min de CO₂. O maior rendimento de extração de astaxantina foi obtido na temperatura de 60 °C e 200 bar de pressão.

No trabalho realizado por Yamaguchi et al., (1986), mencionado anteriormente, reportaram um conteúdo total de carotenóides no óleo extraído de 435-504 µg/g óleo (nas condições de 40°C e 245,2 bar), no qual a composição de carotenóides foi de 48-58% de astaxantina diester, 33-44% de astaxantina monoester, 5-7% astaxantina e 1% sem identificação.

Tanaka e Ohkubo (2003) reportaram dados da extração com SC-CO₂ de lipídeos e carotenóides a partir de ovas de salmão. Estes pesquisadores utilizaram como condições uma faixa de 98 – 314 bar de pressão e 40-80 °C de temperatura, uma vazão de CO₂ de 3 mL/min e 2 horas de extração. A maior recuperação de extração de óleo (cerca de 60 %) foi atingido nas condições de 314 bar e 80 °C. Foi observado que a temperatura constante, o rendimento de extração de óleo aumentou com a pressão. Também estudaram a influência das condições de extração no conteúdo de ácidos graxos no óleo e concluíram que em geral os triglicerídeos de baixo peso molecular são extraídos facilmente a baixas pressões e os de triglicerídeos de alto peso molecular são extraídos facilmente a altas pressões. O rendimento de extração de astaxantina aumentou com a temperatura

e a pressão, e seus resultados mostraram que este carotenóide é estável a altas pressões e temperaturas, ao contrário do reportado por Yamaguchi et.al. (1986).

Considerando os estudos feitos de extração de lipídeos e astaxantina com fluidos supercríticos, pode-se ressaltar que este processo está condicionado pela transferência de massa interna, como foi observado pelo forte efeito do tamanho de partícula e outros pré-tratamentos como a ruptura das paredes celulares de microalgas e leveduras. A relativa baixa solubilidade da astaxantina em SC-CO₂ é um fator muito importante na extração e é notório que são requeridas altas pressões para obter um bom rendimento na extração e que, a adição de um co-solvente polar incrementa a taxa de extração devido ao aumento da solubilidade da astaxantina na mistura de solventes.

Outros estudos sobre a extração de carotenóides com fluidos supercríticos têm sido realizados a partir de matrizes vegetais tais como o buriti, pêssego, tomate, cenoura e pitanga (FRANÇA et al., 1999; ROZZI et al., 2002, MARGARET BARTH et al., 1995; LOPES FILHO et al., 2008).

França et al. (1999) estudaram o efeito da pressão, da temperatura e da vazão de solvente sobre o rendimento de extração de óleo de buriti. Foi reportado que o aumento da pressão de 20 para 30 MPa aumenta significativamente o rendimento de extração de óleo a 40°C. As duas curvas de extração obtidas para estas pressões apresentaram as três regiões que usualmente são encontradas na extração de produtos de fontes vegetais: período de taxa constante de extração, período de taxa decrescente (transição) e período de taxa controlada pela difusão. Além disso, a inclinação da curva no período de extração constante aumenta à medida que a pressão é acrescentada, devido ao incremento da solubilidade do soluto no SC-CO₂. No entanto, as variáveis temperatura e vazão de solvente também afetam, com menos intensidade a inclinação da curva de extração. Nesta

pesquisa, o maior rendimento de extração (7,8 %) foi atingido nas condições de 40 °C, 300 bar e 0,43 g/ s de vazão de CO₂.

Rozzi et al. (2002) estudaram a extração de licopeno, β -caroteno, α -caroteno, α -tocoferol, γ -tocoferol e δ -tocoferol nos extratos supercríticos obtidos a partir de subprodutos do tomate (pele e sementes de tomate). Foram usadas como condições de extração temperaturas entre 32 e 86 °C e pressões entre 137,8 - 482,6 bar e foi avaliado o efeito da vazão e volume de CO₂. Foi encontrada uma relação positiva entre o aumento da temperatura e /ou pressão e a quantidade de licopeno e α -tocoferol extraído. Os dados demonstraram que a altas temperaturas e pressões, a recuperação de todos os carotenóides e tocoferóis aumentou, exceto para δ -tocoferol. Nesse estudo as condições ótimas para a extração de licopeno contendo 7,19 μ g licopeno/g foram 86°C, 344,7 bar e 500 mL de CO₂ com vazão de 2,5 mL/min resultando em uma recuperação de 61% de licopeno.

Na extração supercrítica de β -caroteno a partir de cenoura liofilizada (MARGARET BARTH et al, 1995) foram otimizadas as condições de extração de temperatura (30, 40 e 50 °C), pressão (303,98, 405,30 e 506,62 bar) e concentração de co-solvente (5 e 10%). Na pressão de 303.98 bar o aumento da temperatura aumenta a extrabilidade de α -caroteno e β -caroteno quando adicionado de 5 e 10% de co-solvente. Já, a 405,30 bar este mesmo comportamento foi observado quando foi usado 10% de etanol. Na pressão de 506,62 bar, o aumento da temperatura e o uso de modificador não apresentaram influência significativa, no entanto, a temperatura de 40 °C apresentou um rendimento ligeiramente maior. O melhor rendimento de extração de β -caroteno foi obtido nas condições de 303,98 bar, 50 °C e 10 % co-solvente. Nestas condições o rendimento médio de extração foi de 605 μ g/g e de 485 μ g/g de cenoura seca, para α -caroteno e β -caroteno, respectivamente. Vale a pena mencionar, que o tempo empregado na extração supercrítica foi 1/6 do usado na extração com

solvente orgânico, da mesma forma que a quantidade de CO₂ empregado o qual foi 20 % da mistura de hexano/ acetona na extração tradicional com solvente.

Lopes Filho et. al. (2008) estudaram a extração supercrítica (SC-CO₂) dos carotenóides presentes na pitanga liofilizada (*Eugenia uniflora* L). Foram realizados 14 ensaios envolvendo duas temperaturas (40 e 50 °C) e sete pressões (100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 bar). Os resultados mostraram que a altas pressões, o rendimento global de extração (Xo%) aumenta com o aumento da temperatura, entretanto, a baixas pressões foi encontrado o comportamento inverso, onde o rendimento de extração decresce com o aumento da temperatura a pressão constante. O máximo rendimento global de extração foi obtido a 350 bar e 60 °C, com um valor de 1,033%. A condição operacional de maior concentração de carotenóides (250 bar e 60 °C) apresentou uma concentração de carotenóides no extrato de 5474 µg/g. Entretanto, quando comparado com a extração convencional com acetona a mesma condição operacional extraiu 54,6% dos carotenóides totais que são extraídos com acetona.

2.8 Referências Bibliográficas

ACKMAN, R.G. Fatty Acids in Fish and Shellfish. In: Fatty Acids in Foods and Their Health Implications. 3d ed. Ed. CHOW C. K., CRC / Taylor & Francis, 2008.

ALGATECHNOLOGIES, LTD. Astaxanthin - a super natural antioxidant. Disponível em: <http://algatech.com/astax.htm>, ©2004. Último acesso: 20 de Fevereiro de 2010.

ASSUNÇÃO, A. B.; PENA, R. D. S. Comportamento higroscópico do resíduo seco de camarão-rosa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 4, p. 786-793, 2007.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em camarão rosa (*penaeus brasiliensis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.17, n.3, p. 275-280, 1997.

BRUNNER, G. *Supercritical fluids: technology and application to food processing*. **Journal of Food Engineering**. v. 67, p. 21–33, 2005.

BRUNNER, G. Gas extraction. Ed. Steinkopff Darmstadt Springer, Germany, 1994.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A., MUSCI, M., ANKLAM, E., THEOBALD, A.; VON HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 61-71, 2001.

CHAREST, D.J.; BALABAN, M.O.; MARSHALL, M. R.; CORNELL, J.A. Astaxanthin Extraction from Crawfish Shells by Supercritical CO₂ with Ethanol as Cosolvent. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.10, n. 3, p. 81-96, 2001.

CHEN, H.M.; MEYERS, S.P. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. **Journal of Food Science**, v. 30, n.3, p. 469 – 473, 1982.

CHAO, R.R. Supercritical CO₂ extraction of meat products and edible animal fats for cholesterol reduction. In: Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry, J.W. King and G.R. List, eds. AOCS, IL.,p. 230–246, 1996.

CLIFFORD T. Fundamentals of Supercritical Fluids. Oxford Science Publications, Bombay, 1999.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.3, p. 173–289, 2000

DE PAIVA, R. I. Desempenho da carcinicultura brasileira em 2007: desafios e oportunidades para 2008. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão** – ABCC, 2007.

DEL VALLE, J.M.; AGUILERA, J.M. Review: High pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry. **Food Science and Technology International**, v. 5, n. 1, p. 1-24, 1999.

DI MASCIO, P.; MURPHY, M.E.; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 194S-200S, 1991.

DUNFORD, N.T., TEMELLI, F., LEBLANC, E. Supercritical CO₂ extraction of oil and residual proteins from Atlantic mackerel (*scomber scombrus*) as affected by moisture content **Journal of Food Science** v. 62, p. 289–294, 1997.

FAO - Food and Agriculture Organization-. Departamento da Pesca e Aquicultura da FAO, Serviço de Informação, Dados e Estatísticas da Pesca. FISHSTAT Plus. Universal software para a pesca da estatística de séries temporais. Roma (disponível em CD-ROM e no site [www.fao.org / fi / statist / FISOFT /](http://www.fao.org/fi/statist/FISOFT/)

FISHPLUS.asp). Conjuntos de dados relevantes: a produção da aquicultura (1950-2007 volumes, valores de 1984-2007), a produção de capturas (1950-2007), a produção e o comércio dos produtos da pesca (1950-2007), a produção total (1970-2007), 2007. Último acesso: 29 de setembro de 2009.

FRANÇA, L.F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.M.; MACHADO, N.T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**, v.14, p. 247-256, 1999.

FRONING, G.W.; WHELING, R.L.; CUPPETT, S.L.; PIERCE, M.M.; NIEMANN, L.; SIEKMAN, D.K. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. **Journal Food Science**, v. 55, p. 95-98, 1990.

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

GOUVEIA, L.; CHOUBERT, G.; PEREIRA, N.; SANTINHA, J.; EMPIS, J.; GOMES E. Pigmentation of gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. **Aquaculture Research**, v. 33, n.12, p. 987–993, 2002.

GRAÇA, LOPES R.; TOMÁS, A.R.G.; TUTUI, S.L.S.; SEVERINO-RODRIGUES, E.; PUZZI, A. Fauna acompanhante da pesca camaroeira no litoral do estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 173 - 188, 2002.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M.E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition*. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.5, p. 210-216, 2003.

GUSMÃO, J., LAZOSKI, C., SOLÉ-CAVA, A.M. Population genetic structure in Brazilian shrimp species (*Farfantepenaeus* spp. and *Litopenaeus schmitti*, Decapoda, Penaeidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p.165-171, 2005.

HARDARDOTTIR, I.; KINSELLA, J.E. Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1656-1661, 1988.

HEU, M-S; KIM, J-S; SHAHIDI, F. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. **Food Chemistry**. v. 82, p. 235–242, 2003.

HENRIQUES, S.M.B. SILVA, C.M. R; ALVES, I.C.O.; OLIVEIRA, D.M.; DRUZIAN, J.I., CARNEIRO J.O. *Caracterização da cabeça de camarão P. Vanamei Cultivado*. XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p 1830 (trabalho 232). 08 - 11 de Outubro de 2006, Curitiba, PR. ISBN: 978-85-60299-00-3

HIGUERA-CIAPARA, I; FELIX-VALENZUELA, L; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 185–196, 2006.

HOLANDA, H. D. Hidrólise enzimática dos Resíduos do Camarão Sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e Caracterização dos Subprodutos. Campinas, 2004. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

HUSSEIN, G.; SANKAWA U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 443-449, 2006.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da Pesca 2007 – Brasil. Grandes Regiões e Unidades da Federação, 2007. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/ estatistica_ 2007.pdf](http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/estatistica_2007.pdf). Último acesso: 20 de Fevereiro de 2010.

IBRAHIM, H. M.; SALAMA, M. F.; EL-BANNA, H. A. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, v.43, n.6, p. 418 - 423, 1999.

IGENE. **Aquasta**®, 2007. Disponível em: www.igene.com/study1.html. Último acesso: 20 de fevereiro de 2010.

IPEF- Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. Banco de Dados Legislação Ambiental. Legislação Federal. Disponível em: http://www.ipef.br/legislacao/bdlegislacao/?No_Pai=29&Caminho=25,2,1,0. Último acesso: 20 de Fevereiro de 2010.

KING, J.W., JOHNSON, H.J., FRIEDRICH, J.P. Extraction of fat tissue from meat products with supercritical carbon dioxide. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v.37,p. 951–954, 1989.

KRZECZKOWSKI, R.A. Fatty acids in raw and processed Alaska pink shrimp. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 47, p. 451-452, 1970.

KRZYNOWEK, J.; PANUNZIO L. Cholesterol and fatty acids in several species of shrimp. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 2, p. 237-239, 1989.

LEE, J.E., PENISTON, Q. Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. In: **Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products**. P. 415. Martin, R., Flick, G., and Hebard, C., (Eds). Avi Wesport., CT. USA, 1982

LIM, G-B.; LEE, S-Y.; LEE, E-K.; HAAM, S-J; KIM, W-S. Separation of Astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction, **Biochemical Engineering Journal**, v.11, p. 181–187, 2002.

LIMA, C.M. Mapeamento Tecnológico da astaxantina, Rio de Janeiro, 2008. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

LOPES FILHO, G.; ROSSO, V. V.; MEIRELES, M. A. A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, A. Z.; CABRAL F.A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, p.33-39, 2008.

LÓPEZ, M.; ARCE L.; GARRIDO, J.; RIOS A.; VALCÁRCEL, M. Selective extraction of Astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. **Talanta**, v. 64, p. 726–731, 2004.

LOVELL, R.T. EXPERT PANEL ON FOOD SAFETY AND NUTRITION: Foods from aquaculture. **Food Technology**. v.45, n. 9, p. 87-92, 1991

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

MACHMUDAH, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; SASAKI, M.; HIROSE, T. Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Using Supercritical CO₂ and Ethanol as Entrainer. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 3652-3657, 2006.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M.D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA OSSA, E.; LUBIÁN L.M.; MONTERO O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Nannochloropsis gaditana*. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 245-251, 2005.

MARGARET BARTH, M., ZHOU, C., KUTE, K.M.; ROSENTHALS, G.A. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 2876-2878, 1995.

MEIRELES, M.A.A. Extraction of Bioactive Compounds from Latin American plants. In: Jose Martinez. (Org.). Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, p.243-274. 2008

MENDES, R. L.; FERNANDES, H. L.; COELHO, J. P.; REIS, E. C.; CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J.M.; PALAVRA, A.F. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. **Food Chemistry**, v. 53, p. 99-103, 1995.

MERCADANTE, A. Z. Analysis of Carotenoids. In: *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. SOCACIU C. (Ed). CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

MEYERS, S.P.; BLIGH, D. Characterization of astaxanthin pigment from heat processed crawfish waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, p. 505–508, 1981.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 63, p. 141, 1991

MOURE, A.; CRUZ, J.M. FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.; SINEIRO, J., DOMÍNGUEZ, H.; NUÑEZ, M.J.; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual sources – Review. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

MUKHOPADHYAY, M. Plant and Animal Lipids In: Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC Press, LLC., 2000

NAGUIB, Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of. Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p.1150–1154, 2000.

NARGIS, A.; AHMED, K. N.; AHMED, G. M.; HOSSAIN, M. A.; RAHMAN, M. Nutritional Value and Use of Shrimp Head Waste as Fish Meal. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 41, n.1-2, p. 63-66, 2006.

NILSSON, W.B. Supercritical fluid extraction and fractionation of fish oil. In: *Supercritical fluids technology in oil an lipid chemistry*. Eds. King J.W. e List G.R. AOAC Press. Champaign, Illinois, 1996.

NUNES M. L., MOTA M. H. G., CARDONHA A. M. S. Elaboração de farinha a partir de resíduos de camarão. **Boletim de Ciências do Mar**, v.17, n. 1, p. 1-6, 1978.

OGAWA, M., MAIA, E.L., FERNANDES, A. C., NUNES, M. L., OLIVEIRA, M. I., FREITAS, S. T. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenóides . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 333-337, 2007.

QUISPE-CONDORI S. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia*

verbenácea, Ocimum selloi e Foeniculum vulgaris. Campinas, 2005. 239 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview. **Food Science and Technology International**, v.8, p. 269-284, 2002.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 38, p. 146-166, 2006.

RØDDE, R. H., EINBU, A., VARUM, K. A. seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 388–393, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in foods. ILSI PRESS. International Life Sciences Institute, Washington, D. C., 2001.

ROZZI, N.L.; SINGH, R.K. Supercritical fluids and the food industry. **Comprehensive Review Food Science and Food Safety**, v. 1, p. 33–34, 2002.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N.S. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 5, p. 167–172, 2005.

SACHINDRA, N. M., BHASKAR, N., MAHENDRAKAR, N.S., Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Management**, v. 26, p. 1092–1098, 2006.

SAITO, A.; REGIER, L.W. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 28, n.4, p. 509-512, 1971.

SANCHEZ-VICENTE, Y.; CABAÑAS A.; RENUNCIO, J.A.R.; PANDO, C. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus pérsica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. **Journal of supercritical fluids**, v. 49, p. 167-173, 2009.

SANDLER, S. I. Chemical And Engineering Thermodynamics. John Wiley & Sons, 622 p., 1989.

SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M.; JINAP, S.; KARIM, A.A.; ABBAS, K.A.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR A.K.M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review, **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 240–253, 2009a.

SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M.; JINAP, S.; SAARI, N.; JAHURUL, H.A.; ABBAS, K.A.; NORULAINI N.A. PUFAS in fish: extraction, fractionation, importance in health. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 8, p. 59-74, 2009b.

SEBRAE – SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS -, Aqüicultura e pesca: camarões, 2008. Disponível: [http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/47ACFD29DAFB1D2D832574DC00461D54/\\$File/NT0003906A.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/47ACFD29DAFB1D2D832574DC00461D54/$File/NT0003906A.pdf). *Ultimo aceso: 29 de Setembro de 2009*.

SHAHIDI, F.; BROWN, J.A. Carotenoid Pigments in Seafoods and Aquaculture. **Critical Reviews in Food Science**. v. 38, n.1, p. 1–67, 1998.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n.9, p. 1527 -1532, 1991.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J.; NACZK, M. Utilization of shellfish processing discards. BLIGH, G. *In: Seafood science and technology* : proceedings of the International Conference Seafood 2000 celebrating the tenth anniversary of the Canadian Institute of Fisheries Technology of the Technical University of Nova Scotia, 13-16 May, 1990, Halifax, Canada. (Ed). Oxford : Fishing, p. 300 –304, 1992.

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

SIMPSON, B. K. Pigments from by-products of seafood processing. In: *Maximizing the value of marine by-products*. Ed. Shahidi F. Taylor and Francis Group, LLC , 2006

SIMOPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, essential fatty acids and cardiovascular disease. **European Heart Journal Supplements**, v. 3 (Supplement D), p. D8–D21, 2001.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 Fatty Acids and Cancer. **Indoor and Built Environment**, v.12, p. 405–412, 2003.

TAKESHITA, M. Obtenção de um extrato aromático de camarão a partir de seus resíduos industriais, Campinas, 1981. 127 f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP,

TANAKA, Y.; OHKUBO, T. Extraction of lipids from Salmon Roe with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of oleo Science**. v. 52, n. 6, p. 295-301, 2003.

TANAKA Y., SAKAKI I., OHKUBO T., Extraction of phospholipids from Salmon Roe with supercritical carbon dioxide and an entrainer. **Journal of Oleo Science**, v. 53, n. 9, p. 417-424, 2004.

YAMAGUCHI, K.; MURAKAMI, M.; NAKANO, H.; KONOSU, S.; KOKURA, T.; YAMAMOTO, H.; KOSAKA, M.; HATA, K. Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic krill. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 34, n. 5, p. 904–907, 1986.

3. RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DO RESÍDUO DE CAMARÃO-ROSA

3.1 Resumo

Mediu-se o rendimento de resíduos provenientes do processamento de uma amostra de camarão-rosa (*Penaeus paulensis*) oriunda do litoral do estado de São Paulo. O resíduo que é constituído de cabeça, cauda e casca foi liofilizado e caracterizado quanto a sua composição centesimal (proteínas, cinzas, fibra bruta e lipídeos), teor de astaxantina e composição em ácidos graxos do lipídeo. Os resultados mostraram que aproximadamente 40 % do camarão são subprodutos não consumíveis, que o resíduo seco é rico em proteínas totais (49 % (b.s)) e contém um elevado teor de cinzas (27,0 % (b.s.)). O conteúdo de lipídeos totais apresentou um valor de 4,9% (b.s), que mesmo sendo baixo com relação ao resíduo todo, é maior que os valores reportados na literatura para espécies capturadas no Brasil. Ao analisar a composição em ácidos graxos polinsaturados, destacaram-se os ácidos graxos ω -3, eicosapentanoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), com aproximadamente 24 % do total de ácidos graxos. O conteúdo de carotenóides totais como astaxantina foi de 53 μ g/g resíduo seco usando uma mistura de álcool isopropílico e n-hexano como solvente de extração. A identificação da presença de astaxantina no extrato do camarão-rosa foi comprovada pela comparação com o seu padrão puro, mediante cromatografia de camada delgada (CCD).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material

Uma amostra de 5,0 kg de camarão-rosa fresco, tipo *pistola*, tamanho 11/15 (11 a 15 unidades por libra), proveniente da cidade de Cananéia, São Paulo

(Brasil), foi adquirida no mercado local de Campinas em setembro de 2008. O camarão foi descascado manualmente e o seu resíduo constituído de cabeça, cauda e casca foi separado, congelado a -80°C e seco por liofilização durante 48 h (Liofilizador L101, Liobras, São Carlos, Brasil). Posteriormente, foi triturado em moinho de facas (MARCONI, modelo MA-340, Piracicaba, SP), homogeneizado, acondicionado em potes de vidro âmbar e armazenado a -20 °C, até a realização dos experimentos e das análises.

O padrão de astaxantina foi adquirido da Sigma-Aldrich Co. ($\geq 92\%$, A9335, Lote 037K1235) e Butilhidroxitoluol (BHT, Labsynth, Lote 888353) da Labsynth LTDA (Diadema, SP, Brazil). Todos os solventes foram de grau analítico e providos pela Labsynth LTDA. O nitrogênio comercial (P-4631) foi fornecido pela WHITE MARTINS (PRAXAIR INC., Campinas, SP).

3.2.2 Rendimento de processamento

Os subprodutos do camarão foram separados manualmente do corpo inteiro. Os rendimentos foram determinados por gravimetria, calculados em uma população de 10 camarões escolhidos aleatoriamente, aplicando a seguinte equação:

$$\text{Rendimento de processamento} = \frac{\text{massa do resíduo}}{\text{massa do camarão inteiro}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3.1})$$

3.2.3 Metodologia Analítica

3.2.3.1 Composição centesimal aproximada

Para a determinação de umidade foi utilizado o resíduo fresco e para as demais análises foi usado só o resíduo liofilizado. As análises de composição

centesimal foram feitas em triplicata de acordo à metodologia oficial da AOAC (2006), assim:

- *Umidade*: Determinada por gravimetria por secagem em estufa a 105 °C até peso constante (AOAC 950.46).
- *Proteínas totais*: Determinado pela técnica de micro-Kjeldahl, com fator 6.25 para conversão de nitrogênio para proteína (AOAC 928.08) e realizado no Laboratório de Engenharia de Processos (LEB)/ DEA – FEA – UNICAMP.
- *Resíduo mineral fixo (cinzas)*: Incineração em mufla a 550 °C até peso constante. (AOAC 920.153). e realizado no Laboratório de Engenharia de Processos (LEB)/ DEA – FEA – UNICAMP
- *Teor de fibra bruta*: Digestão com solução de ácido sulfúrico 1,25% (m/v) e hidróxido de sódio 1.25 % (m/v).
- *Extrato etéreo*: Extração com éter de petróleo, em extrator Soxhlet. (AOAC 991.36).

3.2.3.2 Conteúdo de lipídeos totais

Os lipídeos totais foram extraídos e quantificados gravimetricamente usando o método de Bligh e Dyer (1959) modificado por Manirakiza e colaboradores (2001). Na extração, aproximadamente 5,0 gramas de resíduo de camarão liofilizado foram colocados junto a 20 mL de metanol e 10 mL de clorofórmio e agitados por 2 minutos com vórtex. Logo após, 10 mL de clorofórmio foram adicionados, e novamente a mistura foi agitada por 2 minutos. Adicionou-se 18 mL de água destilada e novamente foi agitado por 2 minutos, formando-se duas fases. Mediante centrifugação nas condições de 2000 rpm por 10 minutos as fases foram separadas. A fase pesada foi transferida a um balão de 50 mL com ajuda de uma pipeta Pasteur. Uma segunda extração do resíduo esgotado foi feita usando 20 mL de uma solução 10 % (v/v) de metanol em clorofórmio por agitação em vórtex por 2 minutos. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro

extrato. O clorofórmio foi evaporado em evaporador rotativo (MARCONI, MA-120, Piracicaba, SP) e o resíduo foi seco em estufa a 60°C por 8 horas. O teor de lipídeos final foi quantificado gravimetricamente em triplicata.

3.2.3.3 Extração dos carotenóides presentes no resíduo

A extração dos carotenóides, reportados como astaxantina, foi realizada usando solventes orgânicos, seguindo duas metodologias. Todos os procedimentos empregados foram feitos em ambiente frio e sob luz amarela para evitar degradação do extrato durante a análise.

A primeira metodologia utilizada foi descrita por Saito e Regier (1971) e modificada por Metusalach et al. (1997), onde em 5 g de amostra são extraídos os carotenóides repetidamente usando 20 mL de acetona, até que o pigmento não esteja mais presente no solvente (sem cor). Estes extratos foram reunidos e misturados com uma quantidade igual de éter de petróleo (PE 40-60 °C). A fase extrato de éter de petróleo foi lavada várias vezes com uma solução 0,1 % de NaCl, com a finalidade de remover traços de acetona. Logo depois, o extrato foi filtrado em sulfato de sódio anidro e evaporado sob vácuo a uma temperatura de 40 °C usando evaporador rotativo. O carotenóide concentrado foi dissolvido em hexano e completado até um volume conhecido. Depois de diluí-lo apropriadamente, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro (Perkin Elmer Instruments, Lambda 40, UV/VIS Spectrophotometer, EUA), no comprimento de onda de 472 nm e calculado como é descrito no item posterior.

A segunda metodologia usada foi reportada no trabalho de Sachindra et al. (2006), onde foi estudada a otimização das condições de recuperação (extração) de carotenóides a partir de resíduos de camarão (*Penaeus indicus*) usando diferentes solventes orgânicos polares ou não polares e suas misturas. Nesse estudo as condições otimizadas para o máximo rendimento de extração foi obtida

usando como solvente uma mistura de 60 % (v/v) n-hexano em IPA (álcool Isopropílico) uma relação solvente: amostra de 5:1 e um número de 3 extrações. Esta metodologia foi também empregada na extração e quantificação de astaxantina. O procedimento contemplou a mistura de 5 g de amostra e 25 mL da mistura de solventes mencionada. Três extrações foram feitas e os extratos reunidos foram lavados repetidamente com uma quantidade igual de uma solução de 0,1 % de NaCl, com intuito de separar as fases e retirar da fase de n-hexano, traços de IPA. A fase extrato de n-hexano foi secada por filtração sobre sulfato de sódio anidro e em seguida foi evaporada a uma temperatura de 40 °C usando evaporador rotativo. O extrato seco foi diluído em hexano em um volume conhecido e a absorbância foi medida em um comprimento de onda de 472 nm.

3.2.3.4 Quantificação de carotenóides totais como astaxantina

Para o cálculo da concentração de astaxantina, uma curva de calibração padrão foi construída usando padrão de astaxantina e seguindo a metodologia modificada descrita por Tolasa et al. (2005). Aproximadamente 3 mg de astaxantina padrão e 100 mg de Butilhidroxitoluol foram dissolvidos em 10 mL de diclorometano ($\geq 99,9\%$) com ajuda de um banho de ultra-som. Posteriormente, 1 mL desta solução estoque foi diluída em 10 mL de n-hexano (98,5%). Logo depois de preparada a solução, a absorbância desta solução foi medida em um espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer Instruments, Lambda 40, UV/VIS Spectrophotometer, EUA), num comprimento de onda entre 350-600 nm (região visível). A máxima absorbância foi observada em 472 nm. A concentração de astaxantina na solução estoque foi medida e corrigida (devido à impureza da astaxantina) de acordo à seguinte fórmula:

$$C_{\text{Astaxantina}} (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Absorbância} \times 10000}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \quad \text{Eq. (3.2)}$$

Onde $E_{(1\%, 1\text{ cm})} = 2100$, é o coeficiente de extinção ou a absorbância padrão de uma solução de 1% de astaxantina pura em n-hexano medida em uma cubeta de 1cm a 470 nm; 10000 é um fator de escala. Para preparar a curva de calibração padrão, 0,1, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,25 e 1,5 mL da solução estoque (com concentração corrigida) foram colocados em balões volumétricos de 10 mL, completando o volume com n-hexano. Logo depois mediu-se a absorbância em um comprimento de onda de 472 nm usando o n-hexano como branco. As análises foram realizadas em triplicata. Dados detalhados para a construção da curva de calibração são apresentados no Apêndice 8A.

3.2.3.5 Composição de ácidos graxos

Para a determinação da composição em ácidos graxos, os lipídeos foram extraídos do material liofilizado, seguindo a metodologia de extração com éter de petróleo, em extrator Soxhlet e em seguida, foi realizada a esterificação metílica de acordo com o descrito pelos Métodos Oficiais da AOCS (2006) (AOCS Ca5A-40). Na análise cromatográfica foi utilizado um sistema de Cromatografia Gasosa Capilar – CGC AGILENT 6850 Series GC System e coluna capilar DB-23 AGILENT (50% cianopropil) – metilpolisiloxano, de dimensões 60 m, Ø int: 0,25 mm, 0,25 µm filme.

As condições de operação do cromatógrafo foram: vazão na coluna = 1,00 mL/min.; velocidade linear = 24 cm/seg; temperatura do detector: 280°C; temperatura do injetor: 250°C; temperatura Forno: 110°C – 5 minutos, 110 – 215°C (5°C/min), 215°C – 24 minutos; Gás de arraste: Hélio; Volume injetado: 1,0 µL. A identificação dos ésteres metílicos foi feita mediante comparação do tempo de retenção com padrões previamente injetados. As análises foram feitas em duplicata e a quantificação foi feita mediante a técnica do padrão externo.

3.2.3.6 Identificação da astaxantina e demais carotenóides por meio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Os carotenóides concentrados em n-hexano, extraídos de acordo com o item 3.2.3.3, foram submetidos à Cromatografia de Camada Delgada (CCD) usando placas de sílica gel ativadas de 20 cm × 20 cm (ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄, 0.2mm, Lote 804095, Macherey-Nagel, Alemanha) seguindo o procedimento modificado descrito por Cyanotech Corporation (1998). O extrato concentrado foi colocado (40-50 uL) sobre as placas, junto com o padrão de astaxantina que foi eluído com uma fase móvel de acetona/hexano (25:75 %v/v).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Aspectos gerais da amostra de camarão-rosa

Na Figura 3.1 é apresentada uma fotografia de um camarão-rosa e das partes do seu resíduo que são representativas da amostra usada nos experimentos.



Figura 3.1.-. Fotografia da biometria de um camarão-rosa (*Penaeus paulensis*) representativo da amostra. (a) Camarão inteiro. (b) Subprodutos: cabeça, casca e cauda.

O camarão usado apresentava antenas longas e finas, um conjunto de apêndices bucais, e coloração alaranjada-vermelhada intensa no cefalotórax,

embora principalmente na cauda. O comprimento das amostras analisados oscilaram entre 15,0 e 18,2 cm, com tamanho médio de $17,9 \pm 0,9$ cm.

O corpo do camarão-rosa apresentou três regiões definidas:

- Um cefalotórax rígido (cabeça) na parte anterior;
- O tronco (tórax e abdômen) dividido em 6 segmentos, onde tem-se um exoesqueleto quebradiço (casca) recobrindo o músculo (carne) e onde se inserem os apêndices locomotores ou patas, em número de dez;
- A cauda, na parte posterior.

O camarão-rosa é um dos crustáceos mais utilizados pela alta gastronomia por ser uma espécie com tamanhos variados, textura fibrosa e sabor delicado que se adapta a diversos pratos. Segundo a classificação gastronômica internacional para este tipo de crustáceo, o tamanho do camarão utilizado nesse estudo foi o tipo *pistola 11/15* (11 a 15 camarões por libra), o qual é um camarão *extragrande* que pesa entre 30-40 g cada.

3.3.2 Rendimento de processamento

A Tabela 3.1 reporta valores das variações em massa das partes e seus respectivos rendimentos da amostra estudada. A massa de cada camarão variou entre 26,9 e 34,9 g com média de 30 ± 3 g.

Tabela 3.1.- Peso do camarão e rendimento de processamento das partes.

Componentes	Peso (g) ^a	Rendimento (%)
Músculo	15 - 22 (18 ± 2)	60 ± 3
Cabeça	7 - 11 (8 ± 1)	28 ± 3
Casca	2,0 - 3,0 ($2,3 \pm 0,3$)	8 ± 1
Cauda	0,8 - 1,8 ($1,2 \pm 0,4$)	4 ± 1
Total	27 - 35 (30 ± 3)	100

^a Valores entre parêntesis são as médias de 10 determinações $\pm$ desvio padrão.

A amostra contém aproximadamente 60% de carne e 40% de resíduos, mostrando a elevada porcentagem de subprodutos não consumíveis neste tipo de crustáceo. O rendimento do processamento do camarão é de grande importância econômica para as empresas de beneficiamento e/ou processadoras, já que as perdas em peso no descasque são significativas o que, além de encarecer o produto processado, gera uma enorme quantidade de resíduo. Devido ao alto percentual de resíduos e da concorrência no mercado, foi desenvolvido um estudo pela Associação Brasileira de Criadores de Camarão - ABCC, em 2004, para identificar as novas perspectivas e nichos do mercado. O estudo indicou que existe uma tendência em oferecer diferentes formas de apresentação do produto que possam trazer maior valor agregado, como por exemplo, camarão processado (sem cabeça, sem casca, pré-cozido, temperado etc.) e em apresentações variadas (empanado, em espetinhos, kits prontos para consumo, etc.) (SEBRAE, 2008).

Esta perspectiva de oferecimento de produtos processados faz com que as unidades de processamento gerem uma quantidade enorme de subprodutos, tornando-se para as empresas um lixo orgânico. Estudos divulgados sobre rendimentos de processamento das espécies de camarão cultivadas e capturadas no Brasil são escassos. No entanto, alguns autores, como Holanda (2004) afirmam que o camarão, quando não é vendido “in natura”, é encaminhado para linhas diferenciadas de produção, sendo as mais representativas, a linha de produtos sem cabeça (cefalotórax) e a linha de produtos descascados por completo (sem cefalotórax e exoesqueleto). A primeira linha de produtos indica um aproveitamento médio de 63 %, enquanto a de camarões descascados 53,2 %. Ogawa et al. (2007) reportam que para o caso específico do *Litopenaeus vannamei* encontrado em Fortaleza, CE-Brasil o cefalotórax constitui aproximadamente 33 %, dependendo do tamanho dos animais. Estes valores apresentam-se semelhantes ao rendimento obtido em músculo (carne) e em

subprodutos (resíduos) para o camarão-rosa (*Penaeus pauliensis*) deste trabalho (Tabela 3.1).

Heu et al. (2003) reportaram valores de rendimento de processamento de 48,1% de músculo (carne), 38,9 % de cabeça, 10,7 % de casca e 2,3 % de cauda para o camarão-rosa (*Pandalus borealis*). Em um estudo das diferentes partes do corpo de quatro espécies de camarão da Índia, reportaram-se valores de rendimentos entre 44,0 – 51,5 % de músculo, 33,5 – 45,0 % de cabeça e 11,0 – 15,1 % de casca (incluindo a cauda) (SACHINDRA et.al., 2005a). Na Tabela 3.2., apresentam-se os valores para cada um deles, incluído os resultados deste estudo.

Tabela 3.2.- Rendimento de processamento (%) dos componentes do corpo de diferentes espécies de camarão.

Especie	Origem	Carne	Cabeça	Casca	Cauda
<i>Penaeus monodon</i> ^{a,b}	Índia	51 ± 4xa	34± 2ya	14 ± 3za	--
<i>Penaeus indicus</i> ^{a,b}	Índia	52 ± 2xa	34 ± 2ya	15 ± 1za	--
<i>Metapenaeus dobsonii</i> ^{a,b}	Índia	51 ± 2xa	34 ± 2ya	15 ± 1za	--
<i>Parapenaeopsis stylifera</i> ^{a,b}	Índia	44 ± 1xb	45 ± 1xb	11 ± 1yb	--
<i>Pandalus borealis</i> ^{c,d}	Korea	48	39	11	2
<i>Penaeus paulensis</i>^{c,e}	Brasil	60 ± 3	28 ± 3	8 ± 1	4 ± 1

^a Valores representam as médias de 6 determinações ± desvio padrão. Incluída a cauda. a–b (colunas), x–z (filas): estatisticamente significativo ($p \leq 0.05$); ^b Sachindra et.al., 2005a.

^c Valores representam as médias de 10 determinações ± desvio padrão. ^d Heu et.al., 2003.

^e Neste trabalho.

Ao comparar os dados obtidos com os apresentados na literatura para camarões da Índia e Korea, observa-se um melhor rendimento em carne no camarão-rosa usado neste trabalho, possivelmente devido ao tamanho do mesmo, o qual representa em peso uma maior quantidade de carne, reduzindo assim o peso dos subprodutos. Entretanto, a porcentagem do subproduto do processamento em todos os casos citados contribui entre 40-50% do total em peso do camarão processado, ressaltando assim a grande importância econômica e ambiental, do destino de estes resíduos.

3.3.3 Composição centesimal do resíduo liofilizado

Na tabela 3.3 comparam-se os resultados da composição química do resíduo do camarão-rosa (*Penaeus paulensis*) obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por Assunção e Pena (2007) para o camarão-rosa (*Peneaus subtilis*) proveniente da região metropolitana de Belém (PA) - Brasil.

Tabela 3.3.- Composição química aproximada do resíduo de duas espécies de camarão-rosa.

Componentes %	Camarão-rosa ^c (<i>Peneaus subtilis</i>)	Camarão-rosa ^d (<i>Penaeus paulensis</i>)
Umidade resíduo fresco	n.d	73,9 ± 0,6
Proteínas totais (N x 6,25) ^{a,b}	43 ± 1	49 ± 1
Resíduo mineral fixo (Cinzas) ^{a,b}	22,0 ± 0,2	27,0 ± 0,9
Fibra Bruta ^{a,b}	n.d.	18,2 ± 0,3
Lipídeos totais ^{a,b,e}	n.d.	4,9 ± 0,1
Extrato etéreo (Soxhlet) ^{a,b}	0,94 ± 0,03	4,83 ± 0,06

^aValores em base seca (b.s.); ^bMédia de três determinações ± desvio padrão;

^cASSUNÇÃO e PENA, 2007 ; ^d Neste trabalho; ^e MANIRAKIZA et al, 2001;

n.d. não determinados.

Nota-se que a variação do lugar da captura ou cria, causa uma leve diferença na composição centesimal nas partes não consumíveis do camarão, porém mostra-se mais significativa no conteúdo total de óleo (extrato etéreo). A composição do camarão pode variar de acordo com fatores ambientais tais como estação do ano, a localização e a profundidade da captura, assim como a temperatura da água, alimentação e a maturidade sexual (KINSELLA, 1988).

O conteúdo total de proteína nos resíduos de camarão deste trabalho concorda em ordem de grandeza com valores reportados na literatura. Ibrahim et al. (1999) reportaram valores de 47,75 e 47,43 % de proteínas em cabeças e cascas de camarão da espécie *Penaeus spp.* Nargis et al. (2006) encontraram

49,47 % de proteínas em uma mistura de resíduos das espécies *Penaeus monodon* e *Macrobrachium rosenbergii*. Devido à alta quantidade de proteína presente no resíduo, os estudos realizados para o aproveitamento do mesmo têm sido direcionados principalmente para a produção de farinha e formulações para ração animal como substituto da farinha de peixe (CAVALHEIRO et.al. 2007, FREITAS et al., 2002).

Além do alto teor de proteínas, as análises também mostraram um elevado teor de cinzas de 27,0 %. Ainda que a composição das cinzas não foi analisada, segundo vários estudos realizados, os macro elementos predominantes no resíduo do camarão-rosa do norte (*Pandalus borealis*) são o cálcio, fósforo, sódio, potássio e magnésio e alguns outros minerais em menor proporção como ferro, níquel, zinco e manganês (IBRAHIM et al., 1999; HEU et al., 2003; RØDDE et al., 2008).

Quanto à quantificação de lipídeos totais, a AOAC (2006) recomenda para produtos cárneos o uso do aparelho Soxhlet com éter de petróleo a 60-80 °C. No entanto, os métodos desenvolvidos por Folch et al. (1957) e Bligh e Dyer (1959) tem sido largamente usados e apresentam, apesar da toxicidade dos solventes usados, um maior rendimento de extração em relação ao Soxhlet. Isto é devido ao uso do metanol, que por ser um solvente polar, tem a capacidade de extrair compostos polares, como fosfolipídeos e glicolipídeos (BRUM, 2004), portanto neste trabalho, como mostrado na Tabela 3.3, os lipídeos foram quantificados usando estas duas metodologias e os resultados obtidos foram muito similares.

Na Tabela 3.4, comparam-se valores de conteúdo de lipídeos totais de amostras de resíduos de camarão de espécies capturadas no Brasil e em outras partes do mundo. Confrontando os dados reportados do conteúdo de lipídeos de algumas espécies capturadas no Brasil, o conteúdo de lipídeos foi maior na amostra de camarão-rosa *Penaeus paulensis* deste trabalho.

Tabela 3.4.- Conteúdo de lipídeos em resíduos de camarão de diferentes espécies

Espécie de camarão	Nome comum	País de Origem	Conteúdo de lipídeos totais (%)	Referência
<i>Pandalus borealis</i> ^a	Camarão-rosa	Canadá	2,30	Shahidi e Synowiecki (1991)
<i>Pandalus borealis</i> ^a	Camarão-rosa	Alaska	1,0-4,0	Krzeczkowski (1971)
<i>Pandalus borealis</i> ^b	Camarão-rosa	Korea	0,76	Heu et al. (2003)
<i>Penaeus spp.</i> ^b	n.e.	Egito	7,14	Ibrahim et al. (1999)
<i>Penaeus monodon</i> ^b	Camarão-tigre-gigante	Bangladesh	3,58	Nargis et al. (2006)
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i> ^b	Camarão sete-barbas	Brasil	2,66	Freitas et al.(2002)
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i> ^b	Camarão sete-barbas	Brasil	3,79	Holanda (2004)
<i>Penaeus subtilis</i> ^b	Camarão-rosa	Brasil	0,94	Asunção e Pena, 2007
<i>Panaeus paulensis</i>^b	Camarão-rosa	Brasil	4,9	*Este trabalho

^a Resultados expressados em base úmida; ^b Resultados expressados em base seca (b.s.) n.e. não especificado.

Ibrahim e colaboradores (1999) pesquisando a composição dos resíduos de camarão *Penaeus spp.* do Egito, encontraram um alto conteúdo de lipídeos totais no cefalotórax (cabeça) de 10,5 % (b.s), no exoesqueleto (casca) de 3,78 % (b.s) e um conteúdo médio de 7,14 % no resíduo misturado. Igualmente, em um teste feito para o camarão-rosa usado neste estudo, achou-se que o conteúdo de lipídeos totais presentes na cabeça do camarão é maior (6,9 % b.s) que o teor no resíduo total misturado (4,9% b.s). Este fenômeno pode ser explicado devido a que o depósito de gordura está localizado no hepatopâncreas, o qual fica localizado na região da cabeça (LOVELL, 1991). No estudo de Bragagnolo & Rodrigues-Amaya (1997), encontraram 1,0 % de lipídeos totais na carne de camarão-rosa (*Penaeus Brasiliensis*) proveniente do litoral de São Paulo.

3.3.4 Composição em ácidos graxos dos lipídeos extraídos do resíduo.

A composição em ácidos graxos do óleo extraído dos resíduos do camarão-rosa (*P. paulensis*) encontra-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5.- Perfil de ácidos graxos (g/100 g de ácidos graxos totais) dos lipídeos totais extraídos do camarão-rosa pela metodologia de Manirakiza et al.(2001)

Ácido Graxo		g/100 g de ácidos graxos totais
Saturado		
C12:0	Láurico	0,16
C14:0	Mirístico	1,96
C15:0	Pentadecanóico	1,19
C16:0	Palmítico	16,17
C17:0	Margárico	2,23
C18:0	Estearico	9,40
C20:0	Araquídico	0,70
C22:0	Behênico	-
C24:0	Lignocérico	0,50
Total		32,31
Insaturado		
C16:1	Palmitoléico	5,20
C17:1	Margarolêico	0,98
C18:1 Trans	Elaídico	0,49
C18:1	Oléico	16,85
C18:2 Trans	Linoelaídico	0,19
C18:2 ω -6	Linoléico	2,00
C18:3 Trans	Translinolênico	0,56
C18:3 ω -3	Linolênico	0,43
C18:4 ω -3	Estearidônico	0,16
C20:1	Gadoléico	3,25
C20:4 ω -6	Araquidônico	5,81
C20:5 ω -3	Eicosapentaenóico – EPA	11,69
C22:5 ω -3	Decosapentaenóico	1,51
C22:6 ω -3	Docosahexaenóico – DHA	12,24
Total		61,36
Outros (Não Identificado)	--	6,33
EPA+DHA		23,93
Poliinsaturados/Insaturados		1,90
ω -3/ ω -6		3,3

Foram identificados 23 ácidos graxos, com uma porcentagem total de ácidos graxos saturados e poliinsaturados de 32,31 % e 61,36 %, respectivamente. Dos ácidos graxos saturados, o palmítico (C16:0) foi o predominante com 16,17 % e dos ácidos graxos monoinsaturados mais comuns foram o palmitoleico (5,20 %) e o oléico (16,85 %). Quanto aos ácidos graxos poliinsaturados, os mais abundantes foram o ácido Eicosapentaenóico - EPA (C20:5 ω -3) e o ácido Docosahexaenóico - DHA (C22:6 ω -3). Estes dois ácidos graxos representam cerca 24 % do total de ácidos graxos, com 11,69 e 12,24 %, respectivamente. Também merece ser destacada a relação ω -3/ ω -6, apresentado um valor de 3.3.

Na atualidade a relação de consumo para o homem ocidental, de ômega-6 a ômega-3 é de 15- 20 para 1, o qual resulta altamente elevado (Simopoulos, 2003). Segundo Simopoulos (2001) é consenso científico a necessidade de reduzir a quantidade de ácidos graxos poliinsaturados ômega-6, pelo qual foi recomendado uma relação de ômega-6 a ômega-3, de 4 ou 5 para 1. Esta recomendação nutricional foi feita devido a que a família ômega-6 produz eicosanóides inflamatórios e cancerígenos aumentando o risco de enfermidades crônicas e degenerativas como câncer, aumento da pressão arterial e doenças vasculares e cardíacas, enquanto que os ácidos graxos ômega-3 são antiinflamatórios, antitrombóticos, antiarrítmicos e reduzem os lipídeos do sangue, tendo propriedades vasodilatadoras. (VALENZUELA, 2008). De tal modo, os lipídeos presentes nos resíduos de camarão-rosa são uma boa fonte de ácidos graxos ω -3 e podem oferecer benefícios na saúde humana e no enriquecimento de rações animais.

De acordo com Holanda (2004), os ácidos graxos que apresentaram maior concentração e foram identificados no resíduo de camarão-sete barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) foram C16:0 (16,40 %), C18:0 (8,45 %), C18:1 ω -9 (8,63 %), C20:5 ω -3 (13,22 %), C20:4 ω -6 (7,18 %) e C22:6 ω -3 (20,50 %). Henriques et

al. (2006) reportaram valores de 13% de lipídeos em cabeças de camarão branco cultivado (*Penaeus vannamei*) contendo em sua composição 9,0 % de EPA e 10,0% de DHA. Nos estudos feitos por Krzeczowski (1970) no resíduo do camarão-rosa *Pandalus borealis* reportou-se também um conteúdo de ácidos graxos de 18,5 % de EPA e 13,4 % de DHA. Num estudo feito por Krzynowek e Panunzio (1989) de 11 espécies de camarão *Penaeus (inteiro)*, reportaram como principal ácido graxo saturado o palmítico (C16:0), com valores entre 13,0 e 18,0 %. Quanto aos insaturados, obtiveram-se valores de EPA entre 16,2 e 21,7 % e de DHA entre 9,8 e 15,2 %.

3.3.5 Extração e quantificação dos carotenóides como astaxantina

A Tabela 3.6 apresenta os valores da concentração e rendimento de astaxantina nas extrações com acetona e com a mistura IPA e n-hexano.

Tabela 3.6.- Rendimento de extração e concentração de astaxantina no resíduo do camarão-rosa (*Penaeus paulensis*)

Solvente	Rendimento global de extração ^{a,b} (g extrato/100 g resíduo)	Concentração de ASX no extrato ^{a,b} (µg ASX/g de extrato)	Rendimento de extração de ASX ^{1a,b} (µg ASX/g de resíduo)
Mistura IPA: Hexano (40:60 v/v)	5,3 ± 0,2	1084 ± 42	53 ± 2
Acetona	2,4 ± 0,1	1482 ± 37	34 ± 1

^a Resultados expressados em base seca.(b.s); ^b Média de tres determinações ± desvio padrão

A extração de carotenóides tem sido rotineiramente feita empregando acetona como solvente (SAITO e REGIER, 1971; MANDEVILLE et al., 1991; SACHINDRA et al., 2005b). Britton (1985) recomenda o uso de solventes solúveis em água como metanol, etanol ou acetona para a extração de carotenóides em materiais úmidos. Do mesmo modo, Delgado-Vargas e colaboradores (2000) afirmam que se o material encontra-se previamente seco, se recomenda o uso de solventes não-polares como éter de petróleo ou éter etílico. De Ritter e Purcell (1981) asseguram que para alcançar uma completa extração, as amostras devem

apresentar baixa umidade e devem se usar misturas de solventes ligeiramente polares e solventes não polares. Em concordância com estas hipóteses, a mistura de solventes proposta no trabalho de Sachindra et al. (2006) mostrou ser mais eficiente na extração dos carotenóides dos resíduos de camarão-rosa que o uso só de acetona. Isto é devido a que a mistura de n-hexano e IPA extrai além dos carotenóides, compostos lipossolúveis e não polares aumentando assim a massa de extrato e também o rendimento de extração. Apesar disto, a concentração de astaxantina no extrato obtido com acetona foi em media 36,6 % maior, mostrando a este solvente como de melhor seletividade com relação a este carotenóide, obtendo-se assim uma quantidade de extrato menor, fazendo concentrar mais os carotenóides no extrato. O uso de IPA e n-hexano em vez de acetona traz uma vantagem na extração de carotenoides a grande escala, pois o custo do IPA e hexano é menor do que a acetona e o rendimento obtido é maior.

Shahidi et al. (2000) obtiveram rendimento de 147,7 µg de astaxantina/g de resíduo (b.s.) para o resíduo do camarão-rosa *Pandalus borealis*, enquanto Holanda (2004) reportou um teor de astaxantina no camarão sete-barbas de entre 35,3 e 127,1 µg de astaxantina/g de resíduo (b.s.). No resíduo de camarão *Penaeus indicus*, o conteúdo de astaxantina foi 40,6 µg/g camarão (b.u.) quando extraído com acetona e de 43,9 µg/g camarão (b.u.) quando extraído com uma mistura de IPA :hexano (50:50 v/v) (SACHINDRA et al., 2006).

Para a quantificação da astaxantina, a literatura reporta duas metodologias tradicionalmente empregadas, espectrofotometria (SAITO e REGIER, 1971; MEYERS e BLIGH, 1981; CHEN e MEYERS, 1982; SHAHIDI et al., 2000; SACHINDRA et al., 2006; NIAMNUY et al., 2008) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE- (RUDDAT e WILL III, 1985; SACHINDRA et al., 2005a). A quantificação de astaxantina foi realizada por leitura espectrofotométrica, segundo metodologia de Tolasa et al. (2005), já que esta análise apresenta uma boa estimativa do conteúdo de carotenóides totais como astaxantina, possui um baixo

custo e simplicidade de realização. A metodologia empregada contemplou após a preparação da solução estoque (30 µg Astaxantina/mL), uma correção da concentração desta solução devida à impureza da astaxantina, obtendo-se uma concentração de 27,37 µg ASX /mL num máximo comprimento de onda de 472 nm. Assim, as determinações espectrofotométricas foram realizadas em um comprimento de 472 nm e o cálculo da concentração de carotenóides totais como astaxantina foi feito de acordo com a curva padrão de astaxantina mostrada no apêndice 8A.

3.3.6 Identificação de astaxantina por CCD

A Cromatografia de Camada Delgada é uma técnica amplamente usada para separar e purificar carotenóides devido a sua simplicidade, flexibilidade e baixo custo. A separação por CCD do extrato dos carotenóides do camarão-rosa apresentou 6 bandas diferentes a R_f (Fator de retenção) de 0,34 (laranja), 0,51 (laranja), 0,56 (laranja), 0,69 (amarela), 0,73 (amarela) e 0,77(amarela) como é mostrado na Figura 3.2. A banda laranja a R_f de 0,34 corresponde a astaxantina, como é indicado pelo padrão (b). As bandas laranja a R_f de 0,51 e 0,77 correspondem a astaxantina monoéster e astaxantina diéster respectivamente, como é citado pelo NatuRose Technical Bulletin#003 (CYANOTECH CORPORATION, 1998). Os resultados indicam que a astaxantina livre, a astaxantina monoéster e a astaxantina diéster são os principais pigmentos no camarão-rosa (*Penaeus Paulensis*).



Figura 3.2.- Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato contendo carotenóides presentes no camarão rosa. (a) Extrato IPA: n-hexano. (b) Padrão puro de Astaxantina (>93%).

3.4 Conclusões

Foi avaliado o rendimento do processamento do camarão-rosa, o qual apresentou 40 % de resíduo, valor semelhante ao reportado na literatura.

Na análise centesimal feita no resíduo liofilizado, mostrou-o como uma fonte importante de proteína e minerais (cinzas), semelhante à composição de resíduos de outras espécies *penaeus*. Mesmo que o conteúdo de lipídeos totais no resíduo do camarão seja baixo (4,9% b.s.), este valor foi maior do que os reportados para este crustáceo. Também, observou-se um maior conteúdo de lipídeos no cefalotórax (6,8%) em relação ao resíduo todo

Os ácidos graxos poliinsaturados foram predominantes em relação aos saturados. O principal ácido saturado foi o palmítico (C16:0) e os principais insaturados foram o EPA e DHA, representando 11,69 e 12,24 g/100 g de ácidos graxos totais, respectivamente. Além disso, a razão de ômega-3/ômega-6 foi de 3,3, mostrando-o assim, como uma possível fonte potencial de ácidos graxos essenciais.

A quantificação de astaxantina foi feita espectrofotometricamente e os resultados apresentados foram analisados e expresados como astaxantina livre considerando este carotenóide como o principal componente no extrato, como foi identificado pela comparação com o seu padrão puro, mediante cromatografia de camada delgada (CCD).

Mesmo sendo a acetona o solvente mais comumente utilizado como meio de extração para carotenóides, o presente trabalho indicou que a mistura de álcool isopropílico e n-hexano também apresenta bons resultados na extração de carotenóides a partir de resíduos de camarão, como foi sugerido por Sachindra et al., (2006). Assim, a extração com esta mistura de solventes (polar/não-polar)

atingiu um valor de 5,3 mg/100 g de resíduo seco. Quando usado esta mistura como solvente de extração, obteve-se um rendimento de extração 58 % maior com relação à extração com acetona, no entanto a acetona conseguiu ser mais seletiva com relação aos carotenóides presentes no resíduo, pois a sua concentração no extrato foi maior (1482 µg ASX/g de extrato) do que a obtida com IPA e n-hexano (1084 µg ASX/g de extrato).

3.5 Referências Bibliográficas

ASSUNÇÃO, A. B.; PENA, R. D. S. Comportamento higroscópico do resíduo seco de camarão-rosa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 786-793, 2007.

BLIGH, G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911 - 917, 1959.

BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em camarão rosa (*penaeus brasiliensis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p. 275-280, 1997.

BRITTON, G. General carotenoid methods. In: Law, J.H., Rilling, H.C. (Eds.). **Methods in Enzymology**, vol. 111. Academic Press, New York, p. 113–149, 1985.

BRUM, S.A.A. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. Piracicaba, 2004. 79 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Quiroz”. Universidade de São Paulo, São Paulo.

CAVALHEIRO, J.M.O.; OLIVEIRA DE SOUZA, E.; SINGH BORA, P. Utilization of shrimp industry waste in the formulation of tilapia (*Oreochromis niloticus Linnaeus*) feed. **Bioresource Technology**, v.98, p. 602–606, 2007.

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

CYANOTECH CORPORATION. Thin-Layer Chromatography (TLC). System for NatuRose™. Carotenoids. NatuRose™ Technical Bulletin #003, 1998. Ultimo acesso: 26 de Fevereiro 2010. Disponível: www.ruscom.com/cyan/web02/pdfs/naturese/axbul3.pdf

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing and Stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n.3, p. 173–289, 2000

DE RITTER, E.; PURCELL, A.E. Carotenoid analytical methods. In: *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*. Bauernfeind, J.C. Ed.. Academic Press, New York, p. 815–882, 1981.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p. 497-509, 1957.

FREITAS, A S; LOPES, A.B.; STEPHAN, M.P; CORNEJO, F.E.P., FURTADO, A.A.L. Composição química e protéico - molecular da farinha de resíduos de camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*). **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 111 – 120, 2002.

HEU, M-S; KIM, J-S; SHAHIDI, F. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. **Food Chemistry**, v. 82, p. 235–242, 2003.

HENRIQUES, S.M.B. SILVA, C.M. R; ALVES, I.C.O.; OLIVEIRA, D.M.; DRUZIAN, J.I., CARNEIRO, J.O. *Caracterização da cabeça de camarão P. Vanamei Cultivado*. XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. p 1830 (trabalho 232). 08 - 11 de Outubro de 2006, Curitiba, PR. ISBN: 978-85-60299-003.

HOLANDA, H. D. Hidrólise enzimática dos Resíduos do Camarão Sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e Caracterização dos Subprodutos. Campinas, 2004. 162 f. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição). Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

IBRAHIM, H. M.; SALAMA, M. F.; EL-BANNA, H. A. Shrimp's waste: chemical composition, nutritional value and utilization. **Nahrung**, v.43, n.6, p. 418 - 423, 1999.

KINSELLA, J. E. Fish and Seafoods: Nutritional implications and quality issues. **Food Technology**, p. 146 -149, 1988.

KRZECZKOWSKI, R.A. Fatty acids in raw and processed Alaska pink shrimp. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 47, p. 451-452, 1970.

KRZYNOWEK, J.; PANUNZIO, L. Cholesterol and fatty acids in several species of shrimp. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 2, p. 237-239, 1989.

LOVELL, R.T. O EXPERT PANEL ON FOOD SAFETY AND NUTRITION: Foods from aquaculture. **Food Technology**. v.45, n. 9, p. 87-92, 1991.

MANDEVILLE, S.; YAYLAYAN, V.; SIMPSON, B.K.; RAMASWAMY, H. Isolation and purification of carotenoid pigments, lipids and flavor active components from raw commercial shrimp waste. **Food Biotechnology**, v. 5, p. 185–195, 1991.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 93-100, 2001.

METUSALACH; BROWN, J.A.; SHAHIDI, F. Effects of stoking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Food Chemistry**, v. 59, n.1, p 107-114,1997.

MEYERS, S.P; BLIGH, D. Characterization of astaxanthin pigment from heat processed crawfish waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 505–508, 1981.

NARGIS, A.; AHMED K. N.; AHMED, G. M.; HOSSAIN, M. A.; RAHMAN M. Nutritional Value and Use of Shrimp Head Waste as Fish Meal. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 41, n.1-2, p. 63-66, 2006.

NIAMNUY, C.; DEVAHASTIN, S.; SOPONRONNARIT, S.; VIJAYA RAGHAVAN, G. S. Kinetics of astaxanthin degradation and color changes of dried shrimp during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 87, v. 4, p. 591-600, 2008.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL. Current Through Revision 1, 2006.

OGAWA, M.; MAIA, E.L.; FERNANDES, A.C.; NUNES, M.L.; OLIVEIRA, M.E.B.; FREITAS, S.T. Resíduos do beneficiamento do camarão cultivado: obtenção de pigmentos carotenóides. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 333-337, 2007.

RØDDE, R. H., EINBU, A., VARUM, K. A. seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 388–393, 2008.

RUDDAT, M.; WILL III, O.H. General carotenoid methods. In: **Methods in Enzymology**, vol. 111, Law, J.H., Rilling, H.C. (Eds) Academic Press, New York, p. 189–200, 1985.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N.S. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 5, p. 167–172, 2005a.

SACHINDRA, N.M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N.S. Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. **Lebens Wiss und-Technol**, v. 38, p. 221–225, 2005b

SACHINDRA, N. M., BHASKAR, N., MAHENDRAKAR, N.S., Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Management**, v. 26, p. 1092–1098, 2006.

SAITO, A., REGIER, L.W., Pigmentation of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **Journal Fisheries research board of Canada**, v. 28, n. 4, p. 509-512, 1971.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n.9, p. 1527 -1532, 1991.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J.; NACZK, M.; Utilization of shellfish processing discards. In: Seafood science and technology : proceedings of the International Conference Seafood 2000 celebrating the tenth anniversary of the Canadian Institute of Fisheries Technology of the Technical University of Nova Scotia, 13-16 May, 1990, Halifax, Canada. BLIGH, G (Ed). Oxford : Fishing, p. 300 –304, 2000.

SEBRAE – SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, Aqüicultura e pesca: camarões, 2008. *Ultimo aceso: 25 Agosto de 2009.* Disponível: [http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/47ACFD29DAFB1D2D832574DC00461D54/\\$File/NT0003906A.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/47ACFD29DAFB1D2D832574DC00461D54/$File/NT0003906A.pdf)

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, essential fatty acids and cardiovascular disease. **European Heart Journal Supplements**, v. 3, p. D8–D21, 2001.

SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 Fatty Acids and Cancer. **Indoor and Built Environment**, v.12, p. 405–412, 2003

TOLASA, S., CAKLI, S., OSTERMEYER, U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. **European Food Research and Technology**, v. 221, p. 787-791, 2005.

VALENZUELA, A. Materias grasas como alimentos funcionales e nutraceuticos: Acidos grasos Omega-3. Conferencia administrada no III Simposium Internacional e Innovaciones en Tecnologia de grasas y aceites. SBOG 2008. Campinas, Novembro de 2008.

4. EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE LIPÍDEOS E ASTAXANTINA A PARTIR DE RESÍDUOS DE CAMARÃO-ROSA

4.1 Resumo

A extração com CO₂ supercrítico (SC-CO₂) é uma alternativa promissora, frente às atuais limitações na regulamentação do uso de diversos solventes orgânicos em processos de extração de compostos funcionais e suplementos farmacêuticos. Como alternativa (com relação aos solventes orgânicos) para a extração de lipídeos e astaxantina a partir de resíduos liofilizados (cabeça, cauda e casca) do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) foi utilizado dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂). Foram avaliados os efeitos das condições de extração, pressão (200 - 400 bar) e temperatura (40- 50°C), sobre o rendimento global de extração (X₀ % b.s.), rendimentos de extração de astaxantina e concentração de astaxantina no extrato, e para isto foi feito um planejamento fatorial completo 2² com 4 condições axiais (DCCR). Os resultados mostraram que o máximo rendimento global de extração foi de 2,21 % (b.s.) nas condições de 50 °C e 300 bar (ponto central), tendo uma porcentagem de recuperação de extrato de 68% em relação à extração com n-hexano. Verificou-se que a pressão e a temperatura têm um efeito importante na extração de astaxantina, pois nas pressões mais baixas foram encontradas as mais baixas concentrações de astaxantina nos extratos. Um aumento na pressão aumenta o rendimento de extração devido ao aumento de solubilidade da astaxantina no CO₂, contrário ao que ocorre com o aumento da temperatura apresentando um decréscimo no rendimento. Os extratos obtidos apresentaram uma concentração de carotenóides totais expressados como astaxantina entre 340 e 1074 µg/kg extrato, este último nas condições de 370 bar e 43 °C e próximo ao valor máximo (1084 µg/kg extrato) obtido na extração com solvente orgânico (Capítulo 3).

4.2 Material e Métodos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (EXTRA-E) com a colaboração do Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA-UNICAMP.

4.2.1 Material

Uma amostra de aproximadamente 1,8 kg de resíduos de camarão (cabeça, casca e cauda) foi produzida a partir de 4,5 kg camarão rosa fresco (*Penaeus paulensis*), procedente da cidade de Cananéia, São Paulo (Brasil) e comprada no mercado central de Campinas (SP). Foi medido seu rendimento de processamento conforme ao item 2.3.2 e posteriormente foi acondicionada e mantida sob refrigeração ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes da preparação da amostra para extração.

Todos os solventes usados foram de grau analítico e providos da Labsynth LTDA. O nitrogênio comercial (P-4631) foi fornecido pela White Martins (PRAXAIR INC., Campinas, SP).

4.2.2 Solvente de extração supercrítica

Foi utilizado dióxido de carbono da empresa White Martins (PRAXAIR INC., Campinas, SP) com pureza de 99%.

4.2.3 Preparo da amostra

4.2.3.1 Liofilização

Após a conservação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dos resíduos, estes foram congelados em um ultra-freezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e liofilizados a uma pressão de $50\text{ }\mu\text{m}$ de Hg e -35°C por 48

horas em um equipamento para tal fim (LIOBRAS, Liofilizador L101, São Paulo, SP). O resíduo liofilizado foi acondicionado em frascos âmbar de 1 L de capacidade e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em freezer doméstico (CÔNSUL, modelo 220, São Paulo, SP).

4.2.3.2 Moagem e análise da granulometria do resíduo

O resíduo liofilizado, 400 g aproximadamente, foi triturado em moinho elétrico de facas (modelo MA-340, Marconi, Piracicaba, SP) e classificado por tamanho de partícula usando peneiras vibratórias (Bertel, São Paulo, SP) da série padrão de Tyler de 24 a 400 mesh ($1.00\text{ mm} < d_i < 0,038\text{ mm}$). As condições usadas de peneiragem foram o nível 5 de vibração por um tempo de 20 minutos. Frações de 100 g foram separadas e peneiradas duas vezes cada. As massas retidas em cada peneira foram pesadas em balança semi-analítica (MARTE, modelo AS 5500, São Paulo, SP). Após a pesagem o resíduo liofilizado foi homogeneizado e acondicionado em frascos de 50 mL tipo âmbar hermeticamente fechados, para evitar oxidação dos componentes pela luz e armazenados em freezer doméstico a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cônsul, modelo 220, São Paulo, SP). Em cada frasco foram adicionados aproximadamente 7,0 g de resíduo. O diâmetro médio geométrico foi calculado pela Equação 4.1, que corresponde ao procedimento descrito no método ASAE S319.3, recomendado pela ASAE Standards (1997).

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{i=1}^n w_i} \right] \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde $\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$, d_i é abertura nominal da i-ésima peneira (mm); d_{i+1} é a abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm) e w_i é a massa do material retido na i-ésima peneira.

4.2.4 Umidade

Após a liofilização foi medida a umidade de 2g de amostra do resíduo de camarão, sendo determinada por gravimetria por secagem em estufa a 105°C (Estufa a vácuo, MARCONI, MA 030/12, Piracicaba, SP) até peso constante (AOAC 950.46, 2006). As análises foram feitas em triplicata.

4.2.5 Determinação da densidade real das partículas

Esta análise realizada pela Central Analítica do Instituto de Química (UNICAMP), utilizando-se a técnica de picnometria em gás Hélio. O método utiliza um picnômetro gasoso (MICROMETRICS, modelo Multivolume Picnometer 1305, EUA) e uma balança analítica (QUIMIS, modelo QI-AS, precisão de $\pm 0,0001\text{g}$, EUA). Este equipamento utiliza o gás hélio para medir o volume e a densidade real das partículas sólidas através da técnica de deslocamento de gás.

4.2.6 Determinação da densidade aparente e da porosidade de leito (ε)

A densidade aparente foi calculada usando o volume total da célula de extração e a massa total do resíduo de camarão necessária para empacotá-la. A coluna de extração do sistema consiste de um cilindro de aço inox com 50 cm³ de volume total. A porosidade do leito foi calculada através da Equação 4.2.

$$\varepsilon = 1 - \frac{d_a}{d_r} \quad (\text{Eq.4.2})$$

Onde: d_a = densidade aparente; d_r = densidade real.

4.2.7 Extração com solvente orgânico

Com o objetivo de realizar a comparação da metodologia de extração supercrítica com a extração com solvente orgânico, foi usada a metodologia

modificada proposta por Lèttise et al. (2006). Esta metodologia utiliza 30 mL de n-hexano para extrair os compostos não-polares de 2 g de amostra seca de resíduos de camarão, na temperatura constante de (20 °C) e agitação magnética mantida durante 24 h. Posteriormente, a amostra foi filtrada em sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado sob vácuo com um evaporador rotativo. No final a fração lipídica foi quantificada por gravimetria, em triplicata. Paralelamente, outra extração com solvente foi realizada nos resíduos de camarão, utilizando o método de Bligh e Dyer modificado (1959) (MANIRAKIZA et. al., 2001), como foi mostrado no item 3.2.3.2 do Capítulo 3. Para ambos os métodos, o rendimento de óleo foi calculado conforme a Equação 4.4.

4.2.8 Delineamento experimental

Foram estudadas duas variáveis independentes (pressão e temperatura) usando um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2 , com quatro pontos axiais e três pontos centrais totalizando 11 ensaios (BARROS NETO et al., 2003). As variáveis resposta (dependentes) foram o rendimento global de extração (X_0 %), o rendimento de extração de astaxantina (μg de Astaxantina / g de resíduo de camarão b.s.) e a concentração de astaxantina no extrato (μg de astaxantina por g de extrato). Na Tabela 4.1 apresentam-se os valores reais e codificados dos níveis das variáveis independentes.

Tabela 4.1. - Valores dos fatores estudados no DCCR na extração supercrítica

Variável	Código	Níveis				
		-1,4142	-1	0	+1	+1,4142
Temperatura (°C)	X_1	40	43	50	57	60
Pressão (Bar)	X_2	200	230	300	370	400

As faixas de estudo para as condições de temperatura e pressão foram escolhidas baseadas na literatura de acordo com os dados da revisão bibliográfica do capítulo 2, Tabela 2.7. A análise estatística dos resultados foi realizada por meio da metodologia de Superfície de Resposta e utilizando o software *STATISTICA® 8.0* (StatSoft, Inc., Tulsa, OK 74104, EUA) Foram avaliados os efeitos das variáveis independentes sobre as variáveis resposta no processo de extração usando o *erro puro*, considerando 95% de nível de confiança para todas as variáveis. A matriz do planejamento experimental considerada para o estudo da extração supercrítica de astaxantina e lipídeos do resíduo do camarão é mostrada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2.- Matriz do planejamento para o estudo da extração supercrítica.

Ensaio	X ₁ (°C)	X ₂ (bar)
1	-1 (43)	-1 (230)
2	-1 (43)	+1 (370)
3	+1 (57)	-1 (230)
4	+1 (57)	+1 (370)
5	-1,4142 (40)	0 (300)
6	+1,4142 (60)	0 (300)
7	0 (50)	-1,4142 (200)
8	0 (50)	+1,4142 (400)
9	0 (50)	0 (300)
10	0 (50)	0 (300)
11	0 (50)	0 (300)

Por meio desta metodologia foi possível obter modelos matemáticos para as respostas, tendo como critérios a porcentagem de variação explicada pelo coeficiente de correlação R^2 e o Teste F na análise de variância (ANOVA). Também foram obtidas as superfícies de resposta e as curvas de contorno dos

respectivos modelos matemáticos. O modelo matemático obtido pode ser observado na Equação 4.3.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (\text{Eq. 4.3})$$

4.2.9 Extração com dióxido de carbono supercrítico

4.2.9.1 Unidade experimental

As extrações foram realizadas em uma unidade experimental conforme esquematizado na Figura 4.1. As especificações dos elementos que compõem o sistema de extração supercrítica são apresentadas a seguir:

- Cilindro sifonado com CO₂ **(1)**
- Banho de refrigeração: modelo 12101-30, Cole-Parmer Instrument Company Vernon Hills, IL, EUA **(2)**;
- Bomba de alta pressão: usada para HPLC, modelo AA100S - Eldex, Metering Pump, Eldex Laboratories Inc. Napa, CA, EUA **(3)**;
- Reservatório (tanque pulmão) de aço inox AISI 316, 500mL, Suprilab **(4)**;
- Manômetros tipo Bourdon, Record **(5,6,15)**;
- Extrator de aço inox AISI 316, 50 mL – Suprilab **(7)**;
- Cuba termostatzada: para aquecimento, com sistema de circulação, de dimensões 30 x 40 x 100 cm, de aço inox AISI 304 – Suprilab **(8)**;
- Válvulas tipo agulha, Autoclave Engineers **(9, 10, 16, 17, 18, 19)**;
- Válvula micrométrica, Autoclave Engineers **(15)**;
- Coletor de extrato, frasco tipo penicilina de 50 mL, diâmetro de boca de 20 mm, lacrado **(11)**;
- Medidor de vazão, Modelo 32908-69, Flow – Cole Parmer Instrument Company Vernon Hills, IL, EUA **(12)**;

- Bomba peristáltica: Masterflex L/S 77910, Pump system - Cole-Parmer Instrument Company, EUA **(13)**;
- Totalizador de volume: Modelo G1, Lao Indústrias Ltda, Osasco, SP, Brasil **(14)**;

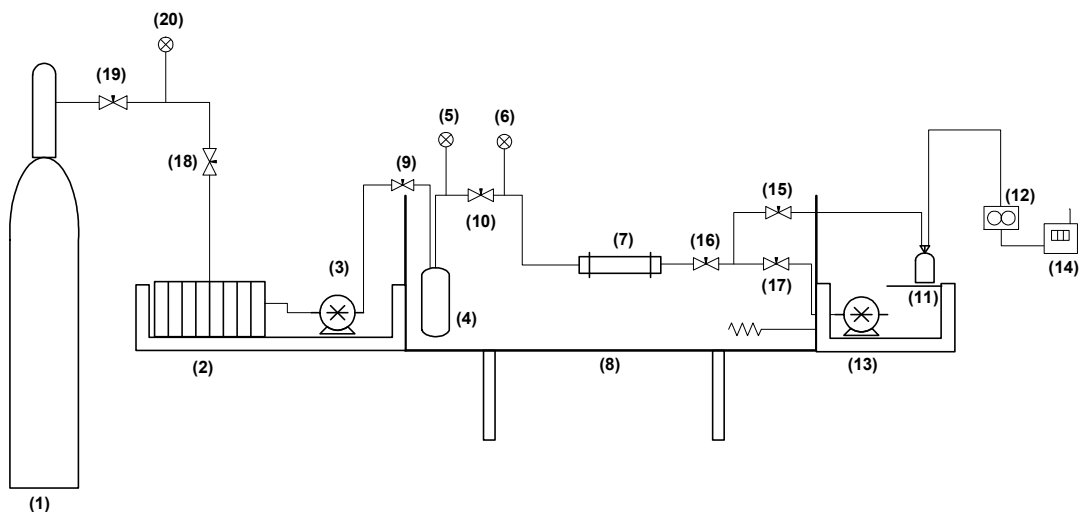


Figura 4.1.- Esquema da unidade experimental para extração supercrítica

4.2.9.2 Procedimento geral de extração

A sequência de operação da unidade de extração é descrita a seguir, os números relacionados correspondem à Figura 4.1. Previamente à realização da extração, o banho de refrigeração **(2)** (com mistura de polietilenglicol-água como fluido refrigerante) foi ligado a uma temperatura de $-10,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em seguida encheu-se de água o banho termostático **(8)**, o qual se manteve aquecido por uma resistência elétrica e imediatamente ajustou-se a condição de temperatura operacional. Depois de alcançadas as condições pré-estabelecidas, o CO_2 proveniente do cilindro sifonado **(1)** foi resfriado e posteriormente pressurizado por meio de uma bomba de alta pressão **(3)** e conduzido até o tanque reservatório (pulmão) **(4)**. A pressão do tanque reservatório foi medida através de um manômetro tipo Bourdon **(5)** e controlada por uma válvula de agulha **(9)**.

A seguir, o extrator foi empacotado manualmente com aproximadamente $7,00 \pm 0,02$ g do resíduo de camarão, previamente pesado (balança analítica, Precisa Instruments, Ref. 18195. Suíça) e completado a volume com pérolas de vidro (3 mm de diâmetro). Logo, o extrator conectado ao sistema e imerso no banho e lentamente pressurizado com as válvulas **(9)** e **(10)** abertas, controlando a sua pressão por meio do manômetro Bourdon **(6)**. Depois de alcançadas a condição de pressão, o sistema foi mantido por um período estático de 20 min, para garantir a estabilização das condições experimentais e promover um maior contato entre o resíduo e o solvente supercrítico. Em seguida inicia-se a extração.

Desta forma, foi continuamente escoado CO₂ supercrítico através do leito e coletou-se o extrato no frasco coletor **(11)** o qual foi previamente pesado, envolto em papel alumínio e acondicionado a temperatura de refrigeração (5°C) durante a extração, para evitar a oxidação dos componentes extraídos. Durante o processo de extração, a pressão foi controlada (manualmente) por uma válvula de agulha **(10)**, a vazão através da válvula micrométrica **(15)** e a temperatura por um termostato adequado ao banho **(8)**.

O CO₂ no estado gasoso que deixa o coletor foi conduzido a um medidor de vazão **(12)** e a um totalizador **(14)** com o intuito de quantificar o CO₂ usado. Após cada coleta, a tubulação usada para retirar o extrato (depois do extrator) foi lavada com n-hexano (98,5 %), com auxílio de uma bomba peristáltica **(13)** para recuperar o extrato que fica retido na tubulação. As amostras foram mantidas sob refrigeração (-20 °C) até a realização das análises posteriores.

4.2.10 Estudo da etapa de extração supercrítica

Para a realização dos ensaios de extração supercrítica foram seguidas duas metodologias: (i) Estudo da cinética das curvas globais de extração (*OEC - Overall Extraction Curves*) e (ii) Rendimento global de extração (X_0 %). As duas

metodologias foram desenvolvidas na unidade experimental descrita no item 4.2.9.1.

(i) *Estudo da cinética das curvas de rendimento global de extração (OEC)*

Foram feitos 10 ensaios em ordem aleatória seguindo as condições para as variáveis formuladas no delineamento experimental proposto no item 4.2.8 com uma replica no ponto central. O tamanho de partícula, a quantidade de amostra ($7,00 \pm 0,02$ g), a massa ($500,0 \pm 0,1$ g) e a vazão de CO_2 ($1,50 \pm 0,01$ L/min) foram mantidos constantes. O tempo de coleta de cada extrato foi de 20, 40, 60, 90, 120, 160 e 200 minutos.

(ii) *Rendimento Global de extração ($X_0\%$).*

Foram realizados 11 ensaios em ordem aleatória gerada pelo software STATISTICA® 8.0, e de acordo com o delineamento experimental indicado no item 4.2.8. *O tempo total de extração foi de 200 minutos. O tamanho de partícula, a quantidade de amostra ($7,00 \pm 0,02$ g), a massa ($500,0 \pm 0,1$ g) e a vazão de CO_2 ($1,50 \pm 0,01$ L/min) foram mantidos constantes, portanto a relação massa de solvente/ massa matéria-prima (S/F) manteve-se invariável.* Os ensaios feitos usando esta metodologia foram empregados para conhecer os resultados do planejamento experimental DCCR.

4.2.11 Cálculo do rendimento global de extração

Após cada extração ou tomada de amostra, o extrato retido na tubulação foi adicionado mediante lavagem com n-hexano ao extrato coletado. Em seguida, o solvente foi evaporado por meio de um evaporador rotativo (MARCONI, MA-120, Piracicaba São Paulo) a 40°C e pressão de -21 polegadas de Hg. Finalmente, o extrato foi seco em estufa a vácuo (Estufa a vácuo MA 030/12 Marconi), nas

mesmas condições da rotoevaporação e com um fluxo constante de nitrogênio comercial com o fim de gerar uma atmosfera inerte. O frasco coletor foi seco até peso constante e foi armazenado preservando-o da luz a uma temperatura de -10 °C.

O rendimento global (X_0 % b.s.) define-se como a quantidade de material solúvel que pode ser extraída de uma matriz a uma dada temperatura e pressão. Se expressa como a razão entre a massa de material solúvel sobre a massa do substrato sólido e foi calculado a partir da relação da massa extraída (extrato + retidos) e a massa inicial adicionada no extrator (base seca), conforme a Equação 4.4.

$$\text{Rendimento Global de Extração } (X_0) (\% \text{ b.s.}) = \frac{\text{g de extrato}}{\text{g de resíduo camarão (b.s.)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.4})$$

4.2.12 Cálculo do rendimento de extração de astaxantina

O rendimento de extração de astaxantina foi calculado em termos da quantificação da massa de astaxantina presente no extrato por cada g de resíduo de camarão usado na extração (Equação 4.5). A metodologia usada para a quantificação da astaxantina foi descrita no item 3.2.3.4.

$$\text{Rendimento de extração de ASX } (\mu\text{g ASX/g resíduo b.s.}) = \frac{\text{massa de astaxantina no extrato}}{\text{massa de resíduo de camarão (b.s.)}} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

4.2.13 Cálculo da concentração de astaxantina no extrato

A concentração de astaxantina no extrato foi calculada relacionando a massa de astaxantina no extrato e a quantidade de extrato obtido, em μg Astaxantina/g extrato, conforme Equação 4.6.

$$\text{Concentração de ASX no extrato } (\mu\text{g ASX/g extrato}) = \frac{\text{massa de astaxantina no extrato}}{\text{massa de extrato}} \quad (\text{Eq. 4.6})$$

4.2.14 Cálculo da recuperação de óleo e astaxantina.

A recuperação de lipídeos na extração supercrítica foi calculada pela comparação com o conteúdo total de óleo presente no resíduo, o qual foi obtido com a metodologia modificada de Bligh & Dyer (1959) (MANIRAKIZA P., et. al., 2001) considerado-lo o máximo que pode ser extraído. Quanto à astaxantina, a sua recuperação foi calculada como uma relação da massa presente no extrato e a máxima quantidade extraída por meio de solvente orgânico (mistura IPA:n-Hexano (40:60 v/v)). Assim, a porcentagem de recuperação de lipídeos e astaxantina foram calculadas conforme as Equações 4.7 e 4.8

$$\text{Recuperação de óleo (\% b.s.)} = \frac{\text{massa de óleo extraído}}{\text{massa de óleo no resíduo camarão (b.s.)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.7})$$

$$\text{Recuperação de astaxantina (\% b.s.)} = \frac{\text{massa de ASX extraída}}{\text{massa de ASX no resíduo de camarão (b.s.)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.8})$$

4.2.15 Metodologia Analítica

4.2.15.1 Quantificação de carotenóides como astaxantina

A determinação dos carotenóides presentes no extrato, reportados como astaxantina, foi realizada após o cálculo do rendimento global de extração, onde o resíduo encontra-se livre de solvente. O extrato seco foi diluído adequadamente em uma quantidade conhecida de n-hexano (98,5%) e sua quantificação foi feita mediante leitura espectrofotométrica (Perkin Elmer Instruments, Lambda 40, UV/VIS Spectrophotometer, EUA) em um comprimento de onda de 472 nm na

faixa de 0,1-0,9 unidades de absorbância (UA), usando n-hexano como branco de referência de calibração. O cálculo da concentração de astaxantina foi realizado por meio da curva de calibração descrita no apêndice 8A, o qual é representado pela Equação 4.9. Todos os procedimentos empregados foram feitos em ambiente frio e sob luz amarela e em triplicata.

$$\text{Concentração de Astaxantina } (\mu\text{g} / \text{mL}) = 4,594 \cdot \text{UA}_{472\text{nm}} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

4.2.15.2 *Identificação da astaxantina por meio de Cromatografia de Camada Delgada (CCD)*

Os carotenóides concentrados em n-hexano (98,5%, Lote 115744), foram submetidos à Cromatografia de Camada Delgada (CCD) seguindo a metodologia apresentada no item 3.2.3.6 do Capítulo 3.

4.2.15.3 *Composição de ácidos graxos no extrato*

Para a determinação dos ácidos graxos foram usados os extratos secos, seguindo o método descrito no item 3.2.3.5 do Capítulo 3.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Acondicionamento da amostra

A umidade e o tamanho de partícula é de fundamental importância no estudo do processo de extração supercrítica e como regra geral, a matéria prima deve ser seca e moída para favorecer a extração (BRUNNER, 1994). A remoção de água libera os poros internos e intensifica a transferencia de massa, devido a que a água na matriz inibe a o escoamento do fluido supercrítico, alterando a tensão superficial como resultado da interação entre solido, água e fluido supercrítico (KAKUDA E KASSAM, 2006)

Britton (1985) recomenda que a extração de carotenóides a partir de material fresco deve ser feita tão rápido quanto seja possível com o intuito de evitar a sua degradação enzimática ou oxidativa. Caso o tecido não possa ser extraído imediatamente, este deverá ser congelado ou liofilizado, sendo não recomendado o uso de secagem com ar ou desidratação com solvente, a causa da possível oxidação e perda de carotenóides (BRITTON, 1985; OLSEN e JACOBSEN, 1995).

A secagem por liofilização tem sido selecionada e recomendada para materiais sensíveis ao oxigênio e ao calor, tais como antioxidantes e carotenóides. Esta metodologia causa pouca alteração sobre os compostos bioativos em comparação com a secagem de ar em estufa. No entanto, a liofilização é uma técnica cara, e devem ser procuradas outras técnicas que apresentem menor custo quando a secagem for feita em escala industrial (ROSA et al., 2008). Com estas considerações, escolheu-se este tipo de secagem para o resíduo do camarão-rosa.

É bem conhecido que a maioria dos crustáceos formam no exoesqueleto complexos de carotenoproteínas que apresentam cores tais como azul, verde, roxo e marrom como é o caso do camarão-cinza (*Litopenaeus vannamei*). O surgimento destes compostos deve ser proveniente da desnaturação por meio de calor, onde a astaxantina é liberada, desenvolvendo a típica cor vermelho-alaranjada (HIGUERA-CIAPARA, 2006; SHAHIDI e BROWN, 1998). No caso do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) como foi mostrado na Figura 2.1 (b), do capítulo 2, o seu resíduo apresenta uma cor alaranjada, dando evidência da presença de astaxantina livre. No entanto, em um teste de cocção feito para uma amostra de 2g a 100°C por 5 min, não se observou mudança de cor. Além disso, no processo de extração de astaxantina com solventes orgânicos (de acordo à descrição feita no item 2.3.5), o espectro de absorção do extrato apresentou um máximo de comprimento de onda em 472 nm, e não em 625 nm como é típico das

carotenoproteínas como a crustacianina (SHAHIDI e BROWN, 1998). Assim, inferiu-se que a amostra de resíduos de camarão-rosa não precisava ser pré-tratada com calor.

Charest et al. (2001), demonstraram que para lagostim-vermelho (*Procambarus clarkii*), a cocção dos resíduos com vapor direto, não apresenta nenhum efeito sobre o rendimento de extração de óleo e astaxantina, contrário ao esperado pois após a cocção, estes componentes seriam mais facilmente extraídos com SC-CO₂. Nesse mesmo estudo, observou-se que o tamanho de partícula não apresenta um efeito significativo sobre a extração de astaxantina, provavelmente devido à baixa espessura da casca, onde a redução do tamanho de partícula não tem um efeito sobre a transferência de massa.

4.3.2 Moagem e granulometria da partícula

Foi obtida uma massa total de resíduo de camarão (*Penaeus pauliensis*) moído de 395,9 g. Deste total, 42 % encontravam-se nas granulometrias entre 16 e 32 mesh. O cálculo do diâmetro médio geométrico das partículas foi de 0,331 mm, como é apresentado no apêndice 8B. Este tamanho de partícula foi mantido constante no processo de extração supercrítica e com solventes orgânicos.

4.3.3 Umidade.

O valor médio de $5,50 \pm 0,06$ % de umidade foi obtido nos ensaios em triplicata.

4.3.4 Densidade real, densidade aparente e porosidade.

O valor médio da densidade real do resíduo de camarão-rosa foi de $1,58 \pm 0,03$ g/cm³. Como apresentado na Tabela 4.3., a densidade aparente foi de $0,5167 \pm 0,004$ g/cm³. O valor calculado da porosidade do resíduo de camarão-rosa, a

partir do valor médio da densidade real e aparente foi de 0,673 ou 67,3 % de permeabilidade ao solvente supercrítico.

Tabela 4.3.- Densidade aparente do resíduo de camarão-rosa.

Ensaio	Massa de amostra (g)	Densidade aparente (g/cm ³)
1	25,260	0,5125
2	25,793	0,5159
3	26,092	0,5218
Media	25,837	0,5167 ± 0,004

4.3.5 Ensaios de extração supercrítica

4.3.5.1 Cinética de extração - Curvas Globais de Extração (OEC)

A Tabela 4.4 apresenta os resultados obtidos no estudo da cinética de extração. No apêndice 8C, apresentam-se os dados mais detalhados.

Tabela 4.4. - Resultados do estudo da cinética de extração do resíduo de camarão-rosa.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Densidade CO ₂ (kg/cm ³) ^a	Massa inicial (g)	Massa de CO ₂ (g)	Massa Acumulada (g)	Rendimento global Extração (Xo % b.s)
1	43	230	851,42	6,9119	498,3	0,1287	1,970
2	43	370	933,43	7,0516	495,6	0,1386	2,080
3	57	230	781,01	7,0533	500,6	0,1251	1,877
4	57	370	884,86	7,1722	495,6	0,1386	2,045
5	40	300	910,13	7,0582	490,8	0,1294	1,940
6	60	300	829,78	7,1446	494,0	0,1326	1,964
7	50	200	785,03	7,0823	498,2	0,1201	1,794
8	50	400	923,20	7,0458	496,7	0,1245	1,852
9a	50	300	870,64	6,9406	492,5	0,1291	1,968
9b	50	300	870,64	7,1691	493,8	0,1389	2,050

^a Angus et al. (2006)

Os resultados mostraram que o rendimento de extração foi semelhante nas diferentes condições estudadas, variando de 1,79 % (200 bar e 50°C) até 2,08 % (370 bar e 43°C). Os ensaios 9a e 9b (300 bar e 50 °C) apresentaram valores de rendimento globais muito similares, confirmando uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos nos experimentos realizados neste equipamento (Figura 4.1). Como mostrado no apêndice 8C, quando usadas altas pressões, como é indicado nos ensaios 2, 4 e 8, a quantidade do extrato nos primeiros 40 minutos de extração é aproximadamente 90 % do total. Do mesmo modo, nos ensaios 7 (79,9 %) (○), 9a-b (85,12 %)(×) e 8 (90,93 %) (▲), nos quais a temperatura se manteve constante (50 °C), um aumento na pressão acrescenta a quantidade de extrato no intervalo de tempo anteriormente mencionado (Figura 4.2). Este fenômeno ocorre devido a que um aumento na pressão incrementa o poder solvente do CO₂ fazendo-o menos seletivo (REVERCHON e DE-MARCO, 2006). Correspondendo com essa tendência, a quantidade de CO₂ requerido para atingir o mesmo rendimento de extração diminui conforme a pressão aumenta.

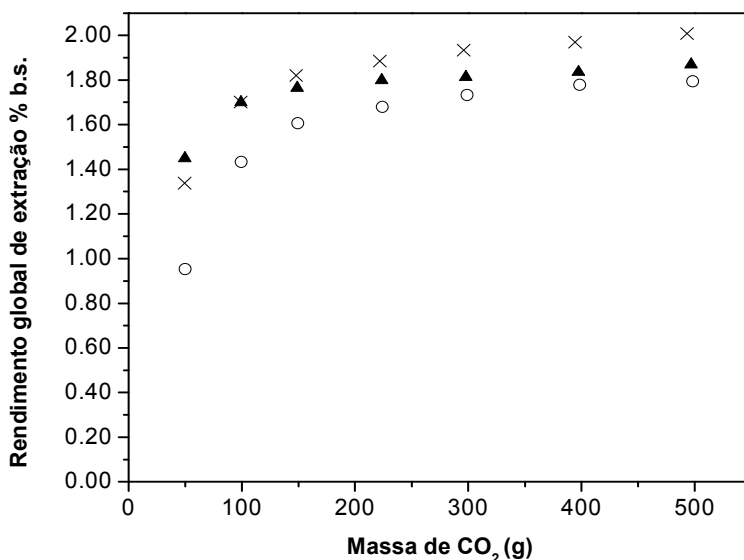


Figura 4.2.- Curvas de cinética de extração a 50 °C em diferentes níveis de pressão, (○) P= 200 bar (Ens. 7), (×) P=300 bar (média dos ensaios 9a e 9b), (▲) P=400 bar. (Ens. 8).

Na figura 4.3. pode-se observar como o aumento da pressão de 230 a 370 bar, nos ensaios 1 e 2, mostra um acréscimo considerável na solubilidade do extrato no CO₂ durante as primeiras etapas da extração. As mesmas considerações podem ser referidas para os ensaios 3 e 4. Ao comparar os ensaios 1 e 3, o aumento da temperatura a baixas pressões (230 bar) provoca uma diminuição da densidade e portanto um menor poder de solubilização do solvente. Em contrapartida, a altas pressões (Ens. 2 e 4), o aumento da temperatura mostra um acréscimo na quantidade de extrato obtida, mas não tão significativo no valor rendimento global de extração.

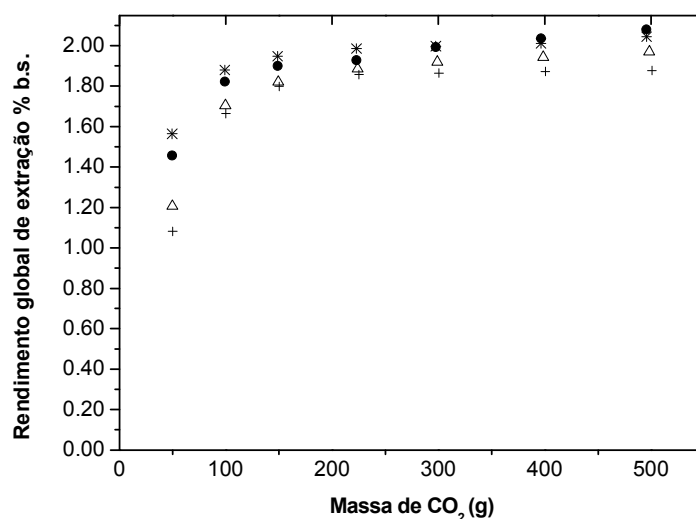


Figura 4.3.- Curvas de cinética de extração, (Δ) T=43°C, P= 230 bar (Ens.1), (●) T=43°C, P= 370 bar (Ens. 2), (+) T=57°C, P= 230 bar (Ens.3), (*) T=57°C, P= 370 bar (Ens.4)

Foi de interesse neste trabalho o estudo da cinética de extração de carotenóides, no entanto, não foi possível devido a que nos primeiros 40 minutos de extração era obtido entre 80 e 90% do extrato (em todas as extrações realizadas) e as quantidades subsequentes de extrato não foram consideráveis para permitir um valor de detecção na metodologia empregada para sua quantificação (espectrofotometria). De acordo a estes resultados e como apresentado nas figuras 4.2 e 4.3, pode se sugerir um tempo de ciclo de extração

de 120 min (aprox. 300 g de CO₂), onde entre 92 e 96% do extrato foi obtido. No entanto, todos os ensaios realizados tanto na metodologia de cinética de extração quanto na metodologia de rendimento global de extração (Xo%) (DCCR) foram realizados até o esgotamento do extrato na matéria-prima, como o intuito de conhecer os máximos rendimentos que poderiam ser obtidos. Na figura 4.4 são comparadas as cinéticas de extração dos ensaios 5, 6 e 9, onde são analisadas três diferentes condições de temperatura, mantendo a pressão constante.

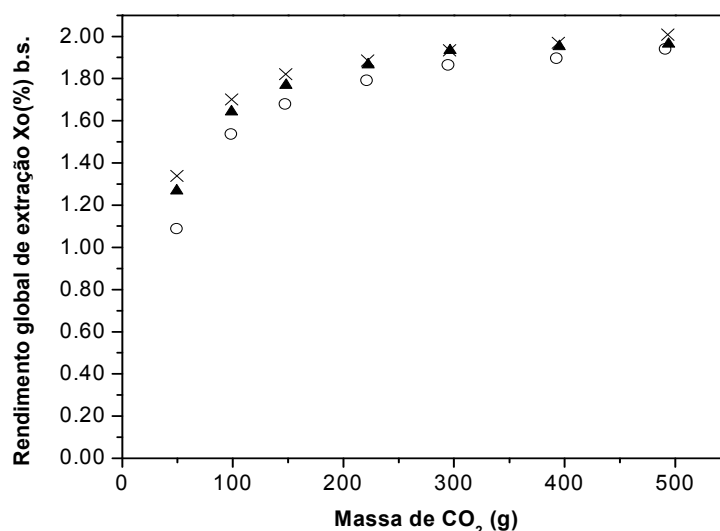


Figura 4.4.- Curvas de cinética de extração a 300 bar em diferentes níveis de temperatura, (O) T= 40 °C (Ens. 5), (X) T=50 °C (média dos ensaios 9a e 9b), (▲) T=60°C (Ens. 6).

Nota-se que a variação de temperatura não mostra uma grande influência sobre o rendimento global de extração, mas apresenta-se um leve decréscimo nas etapas iniciais de extração com o aumento da temperatura de 50 °C (X) para 60 °C (▲). O rendimento diminui possivelmente, pela queda da densidade do CO₂ (870,64 kg/cm³ para 829,78 kg/cm³, respetivamente) e, portanto do poder de solvatação deste solvente nessa condição.

Ao observar as curvas de cinética de extração, não foi possível identificar um período inicial diferenciado de taxa de extração constante, predominando

assim o regime transiente desde o início da extração, onde $\Delta m_{\text{extrato}}/\Delta t$ diminui com o tempo. Este tipo de curva é típico na extração de matrizes com baixo teor de extrato, como é o caso estudado (QUISPE – CONDORI, 2005). A curva de extração apresenta duas zonas: uma que corresponde à solubilidade do material lipossolúvel que se encontra no exterior do tecido e outra onde a extração parece ser controlada pela difusão no interior do tecido (LEAL, 2008).

4.3.5.2 Resultados do planejamento experimental 2² (DCCR)

Na Tabela 4.5 são apresentados os resultados obtidos das variáveis de resposta estudados para o extrato supercrítico do resíduo de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) realizado conforme as condições do planejamento experimental. Dados mais detalhados são encontrados no apêndice 8D.

Tabela 4.5.- Resultados obtidos da extração supercrítica de acordo a matriz do DCCR.

Ens.	T (°C)	P (bar)	ρ_{CO_2} (kg/m ³) ^a	Rendimento Global (X ₀ % b.s.)	Rendimento astaxantina (µg Astaxantina/ g resíduo (b.s.))	Concentração astaxantina (µg Astaxantina/ g extrato)
	X ₁	X ₂		Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	43	230	851,42	1,912	12,396	648,428
2	43	370	933,43	1,928	20,719	1074,459
3	57	230	781,01	1,739	5,927	340,779
4	57	370	884,86	2,006	17,991	897,048
5	40	300	910,13	1,965	19,554	994,934
6	60	300	829,78	2,012	16,534	821,684
7	50	200	785,03	1,924	6,885	357,940
8	50	400	923,20	1,742	17,655	1013,338
9	50	300	870,64	2,256	19,379	859,027
10	50	300	870,64	2,149	18,876	878,549
11	50	300	870,64	2,221	19,267	867,414

^a Angus et al. (2006)

O extrato obtido nas diferentes condições de extração apresentou-se como uma pasta de cor vermelha-alaranjada conforme apresentado na Figura 8H-1 do apêndice 8H.

4.3.5.3 Análise dos efeitos das condições de processo sobre as variáveis resposta

A análise estatística dos resultados descritos anteriormente permitiu a obtenção dos efeitos dos fatores estudados (condições de processo) e suas interações sobre os rendimentos de extração de lipídeos e astaxantina. Os efeitos foram analisados considerando-se o *erro puro* a 95 % de confiança conforme foi descrito no item 4.2.8. Os resultados são apresentados na Tabela 4.6

Tabela 4.6.- Efeito dos fatores sobre as variáveis analisadas segundo o DCCR

Variável	Fator	Efeito	Erro Padrão	p
Rendimento Global (X ₀ % (b.s.))	Media	2,21*	0,03	0,0002
	T	-0,007	0,039	0,87
	T ²	-0,23*	0,05	0,04
	P	0,007	0,039	0,88
	P ²	-0,38*	0,05	0,01
	T*P	0,13	0,06	0,15
Rendimento astaxantina (µg Astaxantina/ g resíduo (b.s.))	Media	19,2*	0,15	0,0001
	T	-3,37*	0,19	0,003
	T ²	-1,58*	0,22	0,019
	P	8,91*	0,19	0,0004
	P ²	-7,35*	0,22	0,0009
	T*P	1,87*	0,26	0,019
Concentração astaxantina (µg Astaxantina/ g extrato b.s.)	Media	868*	6	0,00004
	T	-183*	7	0,001
	T ²	12	8	0,295
	P	477*	7	0,0002
	P ²	-211*	8	0,002
	T*P	65*	10	0,022

Valores estatisticamente significativos: *p<0,05

Após as análises dos efeitos principais e as interações, foram obtidos os coeficientes de regressão para o modelo quadrático que relaciona cada variável resposta com os fatores estudados (pressão e temperatura). Os coeficientes são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7.- Coeficientes de regressão do modelo de segunda ordem para as variáveis resposta do DCCR.

Coeficiente.	Rendimento Global (X_0 % (b.s.))	Rendimento astaxantina (μg Astaxantina/ g resíduo (b.s.))	Concentração astaxantina (μg Astaxantina/ g extrato)
	Y_1	Y_2	Y_3
b_0	2,209*	12,335*	868,330*
b_1	-0,004	20,809*	-91,259*
b_{11}	-0,114*	5,927*	5,791
b_2	0,003	17,991*	238,647*
b_{22}	-0,191*	19,406*	-105,544*
b_{12}	0,062	16,534*	32,560*
%variação explicada	0,79	0,97	0,97
MQreg/MQres	14,70	32,24	62,16
F_{tab}	4,46	5,05	4,53

Valores estatisticamente significativos: * $p < 0,05$

Baseado na porcentagem de variação explicada (R^2) e na distribuição de Fisher (Teste F) para a regressão e falta de ajuste, foi determinada a validade dos coeficientes e dos modelos de segunda ordem. Verificou-se que os modelos das variáveis: rendimento global de extração (X_0 %), rendimento de extração de astaxantina e concentração de astaxantina no extrato apresentaram um $R^2 \geq 0.79$ e valores de $\text{MQreg}/\text{MQres}^2 > F_{\text{tabelado}}$ para a regressão indicando que para estas variáveis o modelo obtido foi significativo e válido para descrever os dados experimentais.

² Relação entre a Média Quadrática da regressão e a Média Quadrática dos resíduos.

O *erro puro* permite avaliar erros associados à operação ou manipulação experimental, sendo assim, foi calculada a relação entre a soma de quadrados do erro puro (SQep) e a total (SQT) para tais variáveis. Esta relação é apresentada na Tabela 4.8.

Tabela 4.8.- Relação entre SQep/ SQTotal para as variáveis resposta estudadas

Variável resposta	Soma de Quadrados Erro Puro (SQep)	Soma de Quadrados Total (SQTotal)	SQep /SQ Total
Rendimento Global	0,006	0,289	0,0208
Rendimento astaxantina	0,140	269,727	0,0005
Concentração astaxantina	191,823	612006,300	0,0003

Observou-se que os valores da relação: SQep/SQT foram pequenos, indicando que as variáveis independentes estudadas estiveram sob controle durante a realização dos experimentos e que a porcentagem que o modelo não conseguiu explicar não foi devida a erros operacionais e sim a falta de ajuste dos modelos obtidos. A seguir apresenta-se a análise dos resultados obtidos para cada uma das variáveis de resposta estudadas e as superfícies de resposta para as variáveis rendimento global de extração (X_0 %), rendimento de extração de astaxantina e concentração de astaxantina no extrato em função dos fatores explorados.

- **Rendimento Global (X_0 %)**

Em concordância com os dados obtidos no estudo da cinética de extração, os resultados mostram que o rendimento global (X_0 %) foi semelhante nas diferentes condições estudadas, variando de 1,74% para 2,21%. Os únicos efeitos significativos no rendimento global de extração (%) foram a temperatura (T^2) ($p=0,04$) e pressão (P^2) ($p= 0,01$), em quanto os termos lineares (T , P) e os de

interação (T*P) não foram estatisticamente significativos. Estes dados de p-valor, indicam que ditos efeitos não são altamente significativos, pois encontram-se próximos ao valor de significância de 0.05, sendo mais evidente no caso da temperatura.

Na Figura 4.5(a, b), pode-se observar que o processo de extração supercrítica apresenta um valor máximo no ponto central, (300 bar e 50 °C), no entanto, quase toda a superfície de resposta apresenta valores de rendimento global de extração maiores que 1,9% (b.s.), mostrando assim a pouca influência da temperatura e a pressão sobre o rendimento global de extração.

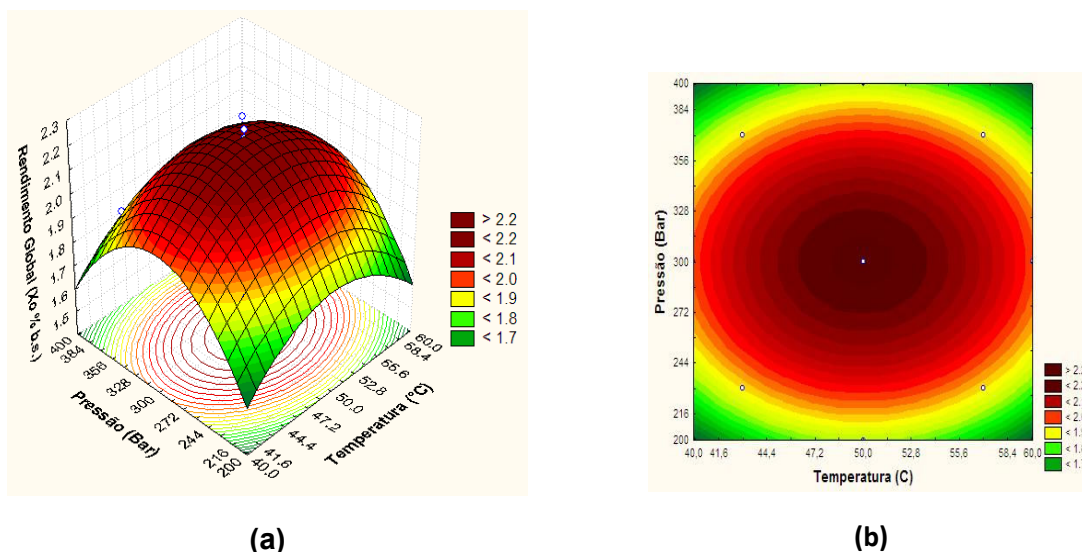


Figura 4.5.- (a) Superfície de resposta e (b) curvas de contorno do rendimento global (X_0 % (b.s.)) de extração em função da pressão (bar) e da temperatura (°C).

Na extração de óleo a partir de ovas de salmão, Tanaka e Ohkubo (2003), observaram que a baixas pressões (177 bar) um aumento na temperatura diminuiu notavelmente o rendimento de extração, enquanto a relativas altas pressões (314 bar) um aumento na temperatura resulta em um ligeiro incremento no rendimento. Este comportamento nota-se semelhante com os resultados obtidos no presente trabalho, pois a baixas pressões (230 bar), um aumento na temperatura de 43 a

57 °C, causa uma queda no rendimento de 9,0 %, devido à diminuição na densidade do solvente, e, portanto no poder de solubilização do CO₂. Já ao aumentar a temperatura de 40 a 50 °C, na condição de 300 bar, o rendimento aumentou 12,5 %.

Hardardottir e Kinsella (1988) reportaram observações similares na pesquisa realizada sobre a extração de óleo e colesterol a partir de truta arco-íris. Neste estudo a recuperação de lipídeos permaneceu constante entre 138 e 345 bar e 40 e 50°C. Por outro lado, Charest et al. (2001), observaram que a pressão (130 bar, 224 bar e 310 bar) e a temperatura (50 °C, 60 °C e 70 °C) não apresentaram um efeito significativo sobre o rendimento de extração de lipídeos com CO₂ supercrítico. Yamaguchi et al. (1986) no estudo da extração supercrítica do óleo do Krill antártico liofilizado (*Euphausia superba*), observaram que ao elevar a temperatura de 40 a 60 e a 80 °C, mantendo a pressão fixa em 245 bar e aumentando a pressão de 245 para 392 bar a uma temperatura fixa de 40 °C, o rendimento de extração de óleo permaneceu quase constante. Poucas pesquisas têm sido realizadas sobre a extração de óleo diretamente da carne de animais marinhos como peixe ou crustáceos, pois a atenção encontra-se focada sobre o fracionamento de óleo de peixe, com o intuito de obter frações ricas em ácidos graxos ω -3.

Estes resultados obtidos na literatura e no presente estudo, podem ser explicados pelo reportado por Mishra et al., 1993, onde se afirma que no músculo de animais marinhos como o peixe, os lipídios estão incorporados em uma matriz de lipoproteína e para que estes possam ser dissolvidos completamente, a ligação da lipoproteína precisa ser quebrada. Isto pode ser conseguido com o uso de altas pressões ou empregando um co-solvente como o etanol no processo de extração supercrítica, onde é aumentada a solubilidade global dos lipídeos em SC-CO₂, incluindo lipídios polares, como fosfolipídios, aumentando assim, o rendimento global de extração

• **Rendimento de extração de astaxantina**

Em relação ao rendimento de extração de astaxantina, os dois fatores estudados apresentaram efeitos significativos. A pressão apresentou um efeito altamente significativo ($p < 0,001$), pois só nas mais altas pressões estudadas foram atingidos os maiores rendimentos de extração de astaxantina. A temperatura apresentou um efeito negativo a baixas pressões, pois um aumento desta variável de 43 a 57 °C a uma pressão de 230 bar provocou uma diminuição de 52 % na quantidade de astaxantina extraída.

O máximo rendimento de extração com valor de 20,72 µg de ASX/g resíduo (b.s.) foi obtido nas condições de 370 bar e 43 °C (Tabela 4.5). É possível verificar através da superfície de resposta e as curvas de contorno que a pressões por acima de 300 bar não se exibe um efeito apreciável da temperatura no aumento do rendimento (Figura 4.6). Também, é importante notar que a menor quantidade de astaxantina extraída foi obtida quando usadas baixas pressões e altas temperaturas, condição na qual a densidade do solvente extrativo é baixa.

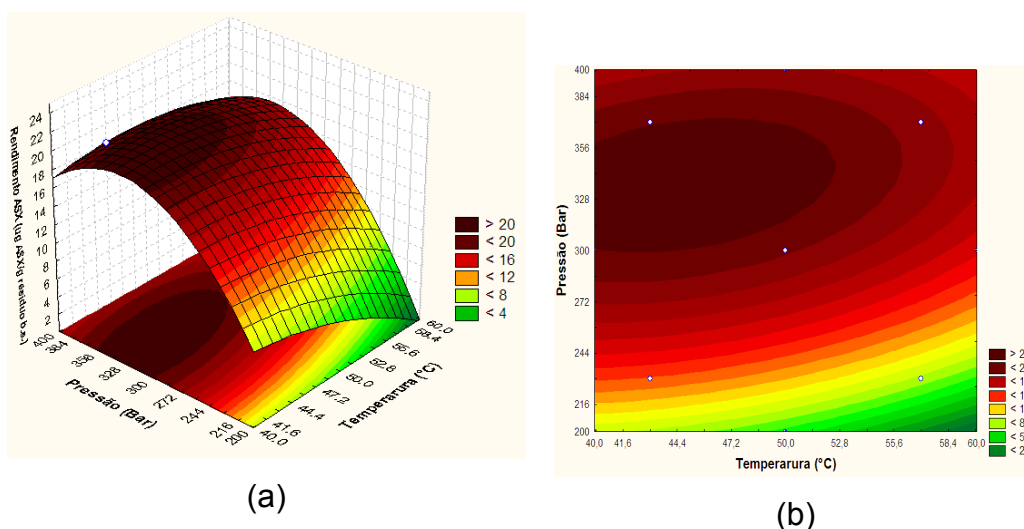


Figura 4.6.- (a) Superfície de resposta e (b) curvas de contorno do rendimento de extração de astaxantina (µg Astaxantina/ g resíduo (b.s.)) em função da pressão (bar) e temperatura (°C) de extração.

Embora, os fluidos supercríticos são apropriados para a extração de compostos que podem ser facilmente degradados pela luz, oxigênio e altas temperaturas como carotenóides, a solubilidade destas substâncias são relativamente baixas comparada com as suas solubilidades em solventes orgânicos e altas pressões devem ser usadas para obter rendimentos razoáveis (MATTEA et al., 2009).

Resultados sobre a solubilidade de astaxantina em CO₂ supercrítico têm sido reportados por alguns autores. De La Fuente e colaboradores (2006), observaram que um aumento na temperatura de 40 para 60 °C a pressão constante de 300 bar, aumenta de 2,8 a 5,1 vezes a solubilidade da astaxantina. Já na temperatura constante de 40 °C, um aumento na pressão de 300 para 500 bar, aumenta a solubilidade de 1,3-1,6 vezes. Youn et al. (2007) mostraram que um aumento na pressão e na temperatura provoca um aumento na solubilidade de astaxantina. Entretanto, estes pesquisadores asseguram que a solubilidade deste carotenóide é fortemente dependente da densidade do CO₂, *pois uma maior solubilidade é obtida quando a densidade do solvente aumenta*, evitando assim o uso de temperaturas elevadas para alcançar altas solubilidades, com a vantagem adicional de limitar a degradação térmica.

Este aumento no poder de solvência do CO₂ é devido à diminuição do coeficiente de difusão a altas densidades, fazendo que a interação entre o solvente e a matriz seja reduzida (SHI et al., 2007). Esta afirmação está de acordo com os resultados obtidos, pois como pode ser observado na Tabela 4.5 nas condições de extração onde o solvente apresenta maior densidade, conseguiu ser extraída a maior quantidade de carotenóides, predominando as temperaturas baixas.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram encontrados por Mendes et al. (2003) na extração de lipídeos e astaxantina a partir da microalga *Chlorella vulgaris*, onde o efeito da temperatura não foi importante no

intervalo de 200 a 350 bar, exceto a 200 bar onde um aumento na temperatura deixa um notável decréscimo no rendimento de extração de astaxantina. Lim et al. (2002) obtiveram o maior rendimento de extração de carotenóides e astaxantina a altas pressões e baixas temperaturas (500 bar e 40 °C), quando foi extraída a partir da levedura vermelha *Phaffia Rhodozyma*.

- **Concentração de astaxantina no extrato**

Analisando os efeitos da pressão e temperatura sobre a variável resposta concentração de astaxantina no extrato, observa-se uma tendência similar ao da variável de resposta rendimento de extração de astaxantina, devido que a quantidade de extrato obtido foi praticamente igual em todas as condições estudadas (pouca variação no rendimento global de extração (X_0 %)). Assim, um aumento na temperatura provocou uma diminuição da quantidade de astaxantina extraída (efeito negativo) e um aumento na pressão mostra um incremento. Na Figura 4.7., mostra-se que a concentração de astaxantina no extrato encontra seus valores mais altos acima de 300 bar e entre 40 e 50 °C, sem apresentar um ponto de máximo. A baixas pressões e altas temperaturas encontra-se o mais baixo conteúdo de astaxantina no extrato.

Como foi mencionado antes, na extração com solvente orgânico (mistura de IPA e n-hexano, item 3.3.5) obteve-se uma concentração de carotenóides totais como astaxantina de 1084 ± 42 µg/g de extrato. Este valor encontra-se próximo ao alcançado na região de altas pressões (≥ 350 bar) e baixas temperaturas ($50 \geq T \geq 40$), o qual indica uma grande vantagem na utilização de solvente supercrítico na recuperação deste tipo de compostos nutracêuticos. Embora o rendimento de extração (X_0 %) com CO₂ ter sido similar para todas as condições estudadas, e, portanto a quantidade de extrato obtida, nesta região de altas pressões e baixas temperaturas, a concentração de astaxantina foi bem diferente,

possibilitando concentrar o extrato supercrítico em níveis praticamente iguais ao da extração com solvente.

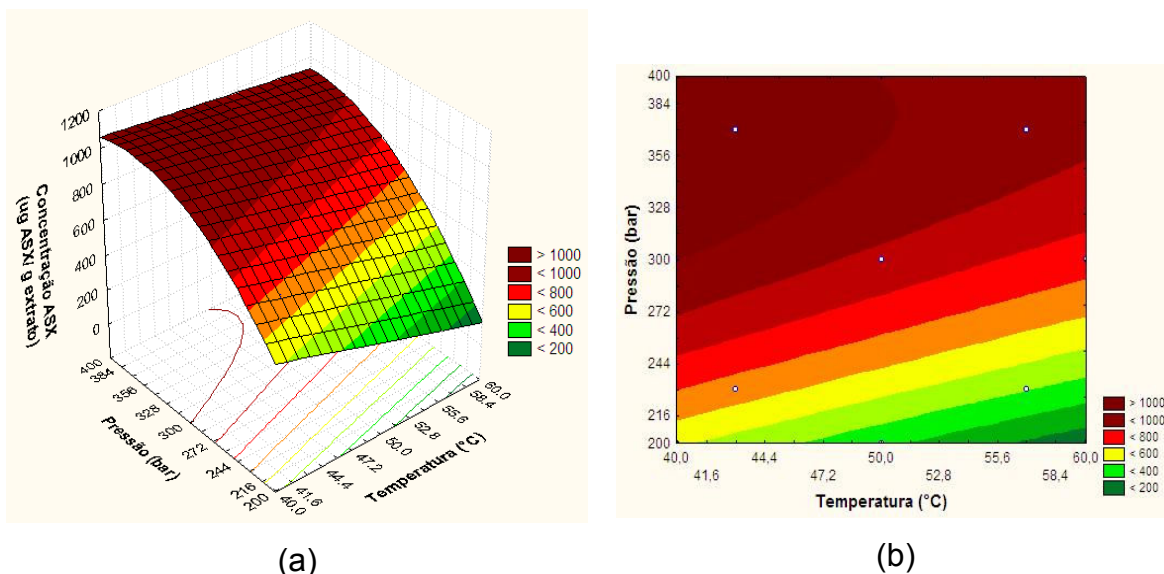


Figura 4.7.- (a) Superfície de resposta e (b) curvas de contorno da concentração de astaxantina ($\mu\text{g ASX/g}$ extrato) no extrato em função da pressão (bar) e da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) de extração.

Yamaguchi et al. (1986), reportaram um decréscimo da concentração de carotenóides totais como astaxantina com o aumento da temperatura em extratos obtidos a partir de Krill a pressão constante de 245 bar. Assim, a 40, 50 e 60°C , obtiveram concentrações de 435-504, 191-243 e 70-87 $\mu\text{g ASX/g}$ de extrato, respectivamente. Entretanto, Tanaka e Okhubo (2003) também observaram um decréscimo na concentração de astaxantina no lipídeo extraído de ovas de salmão ao aumentar a temperatura de 40 a 60 e 80°C , na pressão de 245 bar, com valores de 150-250, 120-80, 110-70 $\mu\text{g ASX/g}$ óleo, respectivamente. Comparando estes resultados com os obtidos no presente trabalho, mostra-se uma tendência similar, já que ao aumentar a temperatura de 43 a 57°C a pressão constante (230 bar, com o intuito de comparar com os trabalhos reportados) a concentração teve uma queda de 648 para 340 $\mu\text{g ASX/g}$ extrato.

4.3.6 Eficiência de recuperação de óleo

Atualmente, um grande número de métodos estão disponíveis para a extração de lipídeos a partir de materiais biológicos. A extração lipídica mais comumente estudada é o método de Bligh e Dyer (1959), este método foi aplicado sobre os resíduos de camarão-rosa obtendo 4,94% de óleo extraído por cada 100 g de resíduo seco. A metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959) permite a extração de todos os lipídios, incluindo os lipídeos polares, fosfolipídios e lipídios provavelmente ligados com outros componentes das membranas celulares. Assim, este será considerado, o maior rendimento de extração que pode ser obtido, embora o seu uso na indústria alimentar não é possível por causa da toxicidade dos solventes utilizados (metanol e clorofórmio).

Por outro lado, a extração com n-hexano também foi realizada sobre os resíduos de camarão-rosa, onde o rendimento de extração foi de $3,3\% \pm 0,1$ (b.s). A extração com n-hexano favorece somente a extração de compostos não polares o que pode explicar por que o rendimento foi menor que o obtido com o método de Bligh e Dyer (1959). No entanto, a extração com n-hexano é comumente utilizada na indústria alimentar, pois este é o único solvente orgânico permitido na extração de óleos comestíveis.

Além disso, devido a sua propriedade não-polar e à similaridade na magnitude das densidades, $0,66 \text{ g/cm}^3$ (20°C) para o n-hexano e $0,78\text{-}0,93 \text{ g/cm}^3$ para o CO_2 , a extração com n-hexano pode ser comparável com a extração de SC-CO_2 . Na Tabela 4.9 é apresentado os dados de recuperação de óleo para cada uma das condições estudadas, com relação às duas metodologias de extração com solvente orgânico.

Tabela 4.9.- Recuperação de óleo por extração com solventes e por extração supercrítica.

Ens.	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rendimento Global (X ₀ % b.s.)	Recuperação % (n-Hexano)	Recuperação % (Bligh & Dyer)
1	43 (-1)	230 (-1)	1,912	58,82	38,70
2	43 (-1)	370 (+1)	1,928	59,33	39,04
3	57 (+1)	230 (-1)	1,739	53,52	35,21
4	57(+1)	370 (+1)	2,006	61,71	40,60
5	40 (-1,41)	300 (0)	1,965	60,47	39,78
6	60 (+1,41)	300 (0)	2,012	61,91	40,73
7	50 (0)	200 (-1,41)	1,924	59,19	38,94
8	50 (0)	400 (+1,41)	1,742	53,61	35,27
9	50 (0)	300 (0)	2,256	69,41	45,67
10	50 (0)	300 (0)	2,149	66,11	43,49
11	50 (0)	300 (0)	2,221	68,34	44,96

Devido a pouca variabilidade do rendimento de extração, a porcentagem de recuperação de óleo em relação ao n-hexano variou entre 53 e 68 %, e 35 e 46 % para a extração com o método Bligh & Dyer (1959). Na extração de óleo de cabeças de sardinha liofilizada, a extração com CO₂ supercrítico foi cerca de 50 % do rendimento de extração com n-hexano, para as condições ótimas estudadas (300 bar e 75 °C) (LÉTISSE et al., 2006). Yamaguchi et al. (1986) obtiveram uma recuperação de 57 % com a extração supercrítica de óleo de Krill nas condições de 245 bar e 60 °C, quando comparada ao máximo extraído pela metodologia de Bligh e Dyer (1959). Eles reportaram que só compostos não-polares ou pouco polares, tais como triacilgliceróis, carotenóides e colesterol, foram extraídos.

Com o intuito de melhorar a extração de lipídeos não polares, a polaridade do CO₂ pode ser alterada pelo uso de co-solventes como metanol ou etanol. Vários pesquisadores relatam que a solubilidade lipídica em SC-CO₂ é aumentada pela adição de etanol, e alguns fosfolipídios são extraídos diretamente em níveis proporcionais ao etanol adicionado (TANAKA et al, 2004; SAHENA et.al., 2009).

4.3.7 Recuperação de astaxantina

Como foi ilustrado no item 3.2.3.3 do Capítulo 3, foram usadas duas metodologias para a extração de carotenóides totais, reportados como astaxantina. A recuperação de astaxantina na extração supercrítica foi comparada com a máxima obtida (53 ± 2 µg Astaxantina/ g resíduo b.s.), a qual corresponde a extração usando IPA e n-hexano como solvente. Na Tabela 4.10, mostra-se que a máxima porcentagem de recuperação atingida foi de 39,04 % nas condições de 370 Bar e 43 °C. Tanaka e Ohkubo (2003) obteve uma recuperação máxima de carotenóides como astaxantina de 30%, nas condições de 314 bar e 40 °C.

Tabela 4.10.- Porcentagens de recuperação de astaxantina na extração supercrítica relativa a extração com n-hexano/IPA.

Ens.	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rendimento de	Recuperação % (n-Hexano/IPA)
			extração de astaxantina (µg Astaxantina/ g resíduo b.s.)	
1	43 (-1)	230 (-1)	12,396	23,26
2	43 (-1)	370 (+1)	20,719	38,87
3	57 (+1)	230 (-1)	5,927	11,12
4	57(+1)	370 (+1)	17,991	33,75
5	40 (-1,41)	300 (0)	19,554	36,69
6	60 (+1,41)	300 (0)	16,534	31,02
7	50 (0)	200 (-1,41)	6,885	12,92
8	50 (0)	400 (+1,41)	17,655	33,12
9	50 (0)	300 (0)	19,379	36,36
10	50 (0)	300 (0)	18,876	35,41
11	50 (0)	300 (0)	19,267	36,15

Nobre et al. (2006) conseguiram uma recuperação de carotenóides de 46,7 % nas condições de 300 bar e 60 °C na extração supercrítica de astaxantina a

partir da alga *Haematococcus pluvialis*, quando foi considerada a extração com acetona como 100% de recuperação. No entanto, neste mesmo estudo, o uso de etanol como co-solvente (10 %) aumentou em 25,6 % a porcentagem de recuperação de carotenóides, quando usadas as mesmas condições de extração.

4.3.8 Composição em ácidos graxos no extrato supercrítico.

A composição de ácidos graxos do óleo extraído a partir de resíduos do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) é apresentada na Tabela 4.11

Os ácidos graxos saturados compõem aproximadamente 40 % dos ácidos graxos totais extraídos. Observa-se uma diminuição na concentração deste tipo de ácidos graxos com o aumento da pressão de extração (aumento na densidade do solvente). Também nota-se que a sua concentração aumentou em todas as extrações em relação à obtida na extração com soxhlet. Os ácidos graxos insaturados representam entre 47-54 % do total de ácidos graxos. A composição em ácidos graxos monoinsaturados permaneceu praticamente invariável, quando comparada com o extrato obtido pela metodologia Soxhlet (AOAC 991.36, 2006). Este comportamento foi mais notório na concentração do ácido oléico (C18:1), a qual foi muito similar nas diferentes condições de extração supercríticas estudadas.

Em relação aos ácidos graxos poliinsaturados, nota-se que a sua concentração aumenta com o aumento da pressão, obtendo-se uma concentração destes ácidos perto de 30 % na condição de 370 bar e 57 °C. Destaca-se também, o efeito da temperatura a altas pressões (370 bar) onde a concentração de ácidos graxos poliinsaturados a 57 °C mostra-se maior do que à concentração a 43 °C. Em concordância, nestas condições foi obtida a maior concentração de ácidos graxos ω -3, atingindo um valor de 18,25 % com relação aos ácidos graxos totais.

Tabela 4.11.- Composição de ácidos graxos (porcentagem de ácidos graxos) dos lipídeos extraídos a partir de camarão-rosa (*Farfantepenaeus Paulensis*) usando SC-CO₂ sob diferentes pressões e temperaturas e a metodologia Soxhlet.

Acido graxo		43°C/ 230 bar	43°C/ 370 bar	57°C/ 230 bar	57°C/ 370 bar	40°C/ 300 bar	50°C/ 400 bar	50°C/ 200 bar	60°C/ 300 bar	50°C/ 300 bar	Soxhlet ^a
		ρ=851.42 kg/m ³	ρ=933.43 kg/m ³	ρ=781.01 kg/m ³	ρ=884.86 kg/m ³	ρ=910.13 kg/m ³	ρ=923.20 kg/m ³	ρ=785.03 kg/m ³	ρ=829.78 kg/m ³	ρ=870.64 kg/m ³	
C10:0	Cáprico	-	0,05	-	0,04	-	-	-	-	0,05	-
C12:0	Láurico	0,61	0,57	0,55	0,52	0,63	0,58	0,64	0,64	0,62	0,16
C14:0	Mirístico	3,75	3,60	3,51	3,24	3,85	3,59	4,03	3,44	3,91	1,96
C15:0	Pentadecanóico	1,81	1,73	1,71	1,56	1,85	1,74	1,94	1,68	1,90	1,19
C16:0	Palmitico	21,76	20,63	20,47	19,04	21,67	20,05	22,21	19,68	21,95	16,17
C16:1	Palmitoléico	6,81	6,50	6,73	6,28	7,40	6,97	7,60	6,82	7,51	5,20
C17:0	Margárico	2,33	2,22	2,20	2,03	2,36	2,21	2,41	2,21	2,43	2,23
C17:1	Margaroléico	0,91	0,94	0,94	0,88	1,03	0,97	1,05	0,96	1,04	0,98
C18:0	Esteárico	9,07	8,53	8,54	8,00	8,82	8,09	8,77	8,13	8,85	9,40
C18:1 Trans	Elaídico	0,81	0,80	0,77	0,72	0,97	0,82	0,63	0,84	0,96	0,49
C18:1	Oléico	16,95	15,49	15,98	15,14	16,32	14,85	16,94	14,78	16,17	16,85
C18:2 Trans	Linoelaídico	0,21	0,21	0,23	0,22	0,26	0,21	0,28	0,21	0,28	0,19
C18:2	Linoléico	6,15	4,35	6,52	7,72	3,14	2,18	2,27	2,09	2,24	2,00
C18:3 Trans	Translinolênico	0,71	0,67	0,68	0,64	0,72	0,66	0,70	0,80	0,91	0,56
C18:3	Linolênico	4,99	3,32	5,90	7,87	1,66	0,55	0,39	0,36	0,40	0,43
C18:4	Estearidônico	-	0,15	-	0,12	0,15	0,19	0,16	0,21	0,17	0,16
C20:0	Araquídico	0,78	0,82	0,76	0,72	0,82	0,81	0,83	0,79	0,87	0,70
C20:1	Gadoléico	1,21	1,18	1,15	1,07	1,25	1,16	1,26	1,16	1,26	3,25
C20:4	Araquidônico	2,14	3,38	2,58	2,96	2,37	4,18	3,26	4,40	3,31	5,81
C22:0	Behênico	0,53	0,55	0,52	-	-	0,57	0,54	0,54	0,58	-
C20:5	Eicosapentanóico – EPA	3,44	6,25	4,48	5,43	6,18	8,31	5,85	8,81	5,91	11,69

Acido graxo		43°C/ 230 bar	43°C/ 370 bar	57°C/ 230 bar	57°C/ 370 bar	40°C/ 300 bar	50°C/ 400 bar	50°C/ 200 bar	60°C/ 300 bar	50°C/ 300 bar	Soxhlet ^a
		$\rho=851.42$ kg/m ³	$\rho=933.43$ kg/m ³	$\rho=781.01$ kg/m ³	$\rho=884.86$ kg/m ³	$\rho=910.13$ kg/m ³	$\rho=923.20$ kg/m ³	$\rho=785.03$ kg/m ³	$\rho=829.78$ kg/m ³	$\rho=870.64$ kg/m ³	
C22:1	Erúico	0,27	0,16	0,17	0,17	0,19	0,17	0,20	0,15	0,25	-
C24:0	Lignocérico	0,16	0,13	0,13	0,14	0,15	0,21	0,17	0,22	0,16	0,50
C22:5	Decosapentanóico	0,52	0,96	0,69	0,83	0,94	1,25	0,90	1,31	0,92	1,51
C22:6	Docosaheptaenóico – DHA	2,25	4,72	3,08	4,00	4,55	6,58	4,23	7,03	4,29	12,24
NI	Não Identificado	11,83	12,09	11,71	10,66	12,72	13,10	12,74	12,74	13,06	6,33
Total ω -3		11,20	15,40	14,15	18,25	13,48	16,88	11,53	17,72	11,69	26,03
SAT (%)		40,80	38,83	38,39	35,29	40,15	37,85	41,54	37,33	41,32	32,31
INSAT(%)		47,37	49,08	49,90	54,05	47,13	49,05	45,72	49,93	45,62	61,36
MONO(%)		26,96	25,07	25,74	24,26	27,16	24,94	27,68	24,71	27,19	26,77
POLI(%)		20,41	24,01	24,16	29,79	19,97	24,11	18,04	25,22	18,43	34,59
SAT/INSAT		0,86	0,79	0,77	0,65	0,85	0,77	0,91	0,75	0,91	0,53
SAT/MONO		1,51	1,55	1,49	1,45	1,48	1,52	1,50	1,51	1,52	1,21
SAT/POLI		2,00	1,62	1,59	1,18	2,01	1,57	2,30	1,48	2,24	0,93
POLY/MONO		0,76	0,96	0,94	1,23	0,74	0,97	0,65	1,02	0,68	1,29

^a AOAC 991.36 (2006)

SAT, Saturado; INSAT, insaturado; MONO, monoinsaturado; POLI, poliinsaturado

ρ = densidade do CO₂

A relação entre ácidos graxos saturados/insaturados aumenta com o acréscimo da pressão e com a densidade do solvente. Da mesma maneira acontece com a relação poliinsaturados/monosaturados, que mostra que um incremento na pressão aumenta a seletividade do CO₂ para compostos com maior grau de insaturação.

Como era esperado, os ácidos graxos EPA e DHA mostraram a mesma tendência de extração dos ácidos graxos poliinsaturados, onde um aumento na pressão e na temperatura leva a um incremento na sua concentração no extrato. Assim, um aumento na temperatura de 50 a 60 °C a pressão constante (300 bar), significou um aumento na concentração de 5,91 % para 8,81 % e de 4,29 % para 7,03 %, ou seja, um aumento de 49 % e de 64 % para EPA e DHA, respectivamente. Em relação a pressão um aumento de 300 para 400 bar a temperatura constante (50 °C), mostrou um aumento de 41 % para EPA e de 53 % para DHA. O máximo teor destes ácidos graxos foi obtido a 300 bar e 60°C, que representa 75,4 % e 57,4 % dos teores de EPA e DHA do óleo obtido pela extração de Soxhlet, respectivamente. Valores semelhantes de teores de EPA e DHA podem ser obtidos nas condições de 50 °C e 400 bar. Pode-se notar que o óleo obtido por extração supercrítica foi fracionado, pois obteve-se um rendimento global ao redor de 2% enquanto que a extração total por soxhlet (extrato etéreo) obteve-se rendimento global de aproximadamente 5 % de óleo, então na extração supercrítica extraiu-se aproximadamente 40 % do óleo com menor teor de EPA e DHA que corresponde a fração de óleo não polar, enquanto que a parte não extraída, mais polar, é mais rica em EPA e DHA que fica retido na matéria prima.

Na extração de lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 a partir da alga *Sargassum hemiphyllum*, Cheung e colaboradores (1998) reportaram que as concentrações de ácido docosapentanoico (EPA) e docosahexanoico (DHA) foram significativamente altas a 37.9 MPa e 40°C. Também, observaram que um

aumento na pressão e na densidade do solvente, incrementa significativamente a concentração de ácidos poliinsaturados totais.

4.3.9 Validação experimental

Com o intuito de testar a validade dos modelos matemáticos obtidos do planejamento experimental proposto, foi realizado um ensaio em triplicata na condição de 400 bar e temperatura de 40°C, e com idênticos parâmetros de extração (vazão e massa de CO₂ e tempo de extração). Estas condições de pressão e temperatura foram escolhidas em virtude de obter a máxima concentração de astaxantina no extrato, as quais segundo a análise estatística da sua superfície de resposta (Figura 4.7) é obtida em ditas condições de temperatura e pressão. Os resultados são apresentados na Tabela 4.12 (dados mais detalhados são mostrados no apêndice 8E).

Tabela 4.12.-Resultados da validação experimental dos modelos obtidos no planejamento experimental DCCR (T=40 °C, P=400 bar)

Resultado	Valor experimental ^a	Valor predito	% DR ^b
Rendimento Global (X ₀ % b.s.)	1,95 ± 0,04	1,60	17,69
Rendimento de extração de ASX (µg Astaxantina/g resíduo b.s.)	17 ± 1	17,1	1,91
Concentração astaxantina (µg Astaxantina/ g extrato)	894 ± 33	1061	-18,65

^a Valores obtidos nas condições de 40° C e 400 bar.

^b Desvio relativo = [(valor experimental - valor predito)/ valor experimental]*100.

Baseado nos valores de desvio relativo (%DR) obtidos para cada variável de resposta considerou-se que os modelos empregados foram satisfatórios para predizer os valores experimentais do rendimento de extração de astaxantina. Apesar das outras variáveis apresentarem desvios relativos mais elevados, mesmo assim podem ser consideradas aceitáveis, e podem ser usados com

finalidades de avaliar o processo. Nesta condição também foi analisado o perfil de ácidos graxos nestas condições de extração, cujos resultados são mostrados no apêndice 8F. O conteúdo de EPA e DHA foi de 8,94 e 7,34 %, respectivamente. De acordo com os resultados anteriormente obtidos, um aumento na pressão de 300 a 400 bar na temperatura de 40°C, provoca um aumento considerável no teor destes ácidos graxos poliinsaturados no extrato (Tabela 4.13). Enquanto que, um aumento na temperatura de 40 a 50 °C na pressão de 400 bar, não apresenta grande efeito, mas são preferidas as baixas temperaturas. Estes resultados concordam com o discutido no item 4.3.8.

Tabela 4.13.- Conteúdo de EPA e DHA em algumas condições de processo estudadas.

T (°C)	P (Bar)	% EPA	%DHA
40	300	6,18	4,55
40	400	8,94	7,34
50	400	8,31	6,58

4.3.10 Identificação da astaxantina por CCD

Na Figura 4.8, (a) representa o padrão de astaxantina, (b) o extrato de solvente orgânico (IPA/n-hexano) e os números (1-11) as corridas feitas na extração supercrítica de acordo com a Tabela 4.2. A separação por CCD do extrato do camarão-rosa mostrou 6 diferentes bandas, com Rf 0,33 (laranja), 0,52 (laranja), 0,57 (laranja), 0,69 (amarelo), 0,73 (amarela) e 0,78 (amarela), como mostrado na Figura 4.8.

Uma banda laranja de Rf 0,33 corresponde a astaxantina, conforme indicado pelo padrão (a). As bandas de laranja de Rf 0,52 e 0,78 correspondem a monoéster astaxantina e diéster astaxantina, respectivamente, como citado por Naturose Boletim Técnico#003 (Cyanotech Corporation, 1998).

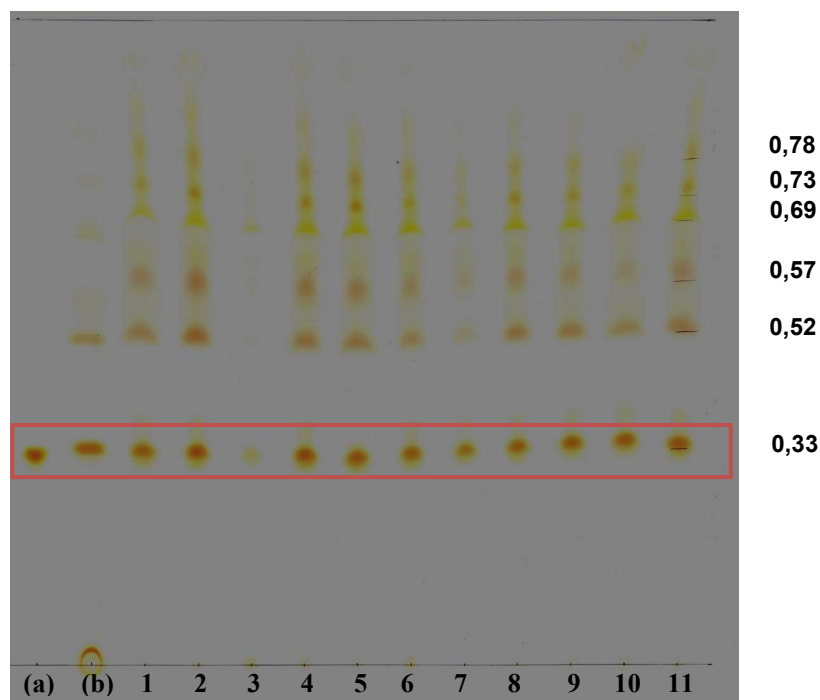


Figura 4.8.- Cromatografia de Camada Delgada dos extratos supercríticos do camarão-rosa sobre sílica gel.

Os experimentos 3 e 7 mostraram uma baixa intensidade das bandas devido à pequena quantidade de carotenóides extraídos. Os resultados indicam que a astaxantina livre, monoéster astaxantina e diéster astaxantina são os principais pigmentos no camarão-rosa (*Farfatepenaeus paulensis*). Sachindra et al. (2005) reportaram dados de Rf similares na identificação dos carotenóides de caranguejo marinho (*Charybdis cruciata*). Yamaguchi et al. (YAMAGUCHI et al., 1983) identificaram por meio deste tipo de cromatografia a presença de vários carotenóides no camarão Krill antártico (*Euphasia superba*): astaxantina diester, astaxantina monoester, astaxantina.

4.4 Conclusões

No estudo das curvas de cinética de extração, não conseguiu identificar-se um período inicial diferenciado de taxa de extração constante (CER), predominando assim o regime transiente desde o início da extração. Verificou-se também, que quando usadas altas pressões, a quantidade do extrato nos primeiros 40 minutos de extração é aproximadamente 90% do total, possibilitando a diminuição do tempo de extração e da quantidade de solvente empregado.

Os modelos das variáveis, rendimento global de extração ($X_0\%$ b.s.), rendimento de extração de astaxantina e concentração de astaxantina no extrato, foram avaliados mediante a porcentagem de variação explicada (R^2) e o teste F, indicando que para estas variáveis o modelo obtido foi significativo e válido para descrever os dados experimentais. Verificou-se também que as variáveis independentes estudadas estiveram sob controle durante a realização dos experimentos e que a porcentagem que o modelo não conseguiu explicar não foi devida a erros operacionais e sim a falta de ajuste dos modelos obtidos.

Observou-se que a pressão e a temperatura mostram um efeito pouco significativo sobre o rendimento de extração de óleo com CO_2 supercrítico, pois os resultados mostram que o rendimento global de extração foi semelhante em diferentes condições estudadas, variando de 1,74 % para 2,21 %. O máximo rendimento de extração foi encontrado nas condições de 300 bar e 50 °C. A porcentagem de recuperação de óleo com relação ao n-hexano variou entre 53 e 68 %, e 35 e 45 % para a extração com o método Bligh & Dyer (1959).

Tanto a temperatura quanto a pressão, apresentaram um efeito significativo sobre o rendimento de extração de astaxantina, enquanto a pressão exibiu um efeito maior. A maior quantidade de astaxantina extraída foi obtida nas condições de 43°C e 370 bar, com uma porcentagem de recuperação de 39 %. Na faixa de

baixas pressões, o aumento da temperatura resultou em uma diminuição no rendimento de extração de astaxantina.

Mostrou-se que na variável concentração de astaxantina no extrato, apresenta-se um efeito significativo da pressão e temperatura, indicando uma tendência similar com a variável resposta rendimento de extração de astaxantina. Na região de altas pressões (≥ 350 bar) e baixas temperaturas ($50 \geq T \geq 40$), apresentaram-se valores de concentração acima de 1000 μg ASX/g extrato, valores próximos aos obtidos com a extração de carotenóides reportados como astaxantina com solvente orgânico (IPA+HEXANO). Este resultado indica uma grande vantagem na utilização de solvente supercrítico na recuperação deste tipo de compostos nutraceuticos.

Um aumento na temperatura e na pressão apresenta um incremento na extração dos ácidos graxos EPA e DHA no extrato. A máxima recuperação destes ácidos graxos foi de obtida a 300 bar e 60°C, sendo de 75,4 % e 57,4 % para EPA e DHA, respectivamente. No entanto valores semelhantes de recuperação podem ser obtidos nas condições de 50 °C e 400 bar.

Mediante a Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi possível identificar a presença de astaxantina e seus ésteres nos extratos supercríticos de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*).

4.5 Referências Bibliográficas

ANGUS, ARMSTRONG B., REUCK K.M., Carbon Dioxide: International Thermodynamic Table of the Fluid State, vol. 3, Pergamon Press, New York, p. 266, 1976.

ASAE. Standards Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieveing. ASAE, S319.3, p. 547, 1997.

BLIGH, G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911 - 917, 1959.

BRUNNER, G. Gas extraction. Ed. Steinkopff Darmstadt Springer, Germany, 1994.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

BRITTON, G. General carotenoid methods. In: Law, J.H., Rilling, H.C. (Eds.), **Methods in Enzymology**, v. 111, p. 113–149, Academic Press, New York, 1985.

CHEUNG, P.C.K.; LEUNG, A.Y.H.; ANG, JR.P.O. Comparison of supercritical carbon dioxide and Soxhlet extraction of lipids from a Brown Seaweed, *Sargassum hemiphyllum* (Turn) C. Ag. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 46, p. 4228-4232, 1998.

CYANOTECH CORPORATION. Thin-Layer Chromatography (TLC). System for NatuRose™. Carotenoids. NatuRose™ Technical Bulletin #003, 1998. Último acesso: 26 de Fevereiro 2010. Disponível:
:www.ruscom.com/cyan/web02/pdfs/naturese/axbul3.pdf

CHAREST, D.J.; BALABAN, M.O.; MARSHALL, M.R.; CORNELL, J.A. Astaxanthin Extraction from Crawfish Shells by Supercritical CO₂ with Ethanol as Cosolvent. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v.10, n. 3, p. 81-96, 2001.

DE LA FUENTE, J.C.; OYARZPÚN, B.; QUEZADA, N.; DEL VALLE, J.M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide, **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, n. 1-2., p. 90–95, 2006.

HARDARDOTTIR, I.; KINSELLA, J.E. Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1656-1661, 1988.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L; GOYCOOLEA, F. M. Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 185–196, 2006.

KAKUDA, Y.; KASSAM L.S. Supercritical Fluid Technology for Extraction of Bioactive Components In: Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies. Ed. SHI JOHN, CRC Press, 2006

LÉTISSE, M., ROZIÈRES, M., HIOL, A., SERGENT, M, COMEAU, L. Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifier I. Optimization of extraction conditions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n, 1, p. 27-36, 2006.

LIM, G-B.; LEE, S-Y.; LEE, E-K.; HAAM, S-J; KIM, W-S. Separation of Astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction, **Biochemical Engineering Journal**, v.11, p. 181–187, 2002.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P.; Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, n.1, p. 93-100, 2001.

MATTEA, F.; MARTIN, A.; COCERO, J.M. Carotenoids processing with supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 93, n. 3, p. 255-265, 2009.

MENDES, R. L.; FERNANDES, H. L.; COELHO, J. P.; REIS, E. C.; CABRAL, J. M. S.; NOVAIS J.M.; PALAVRA A.F. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. **Food Chemistry**, v. 53, p. 99-103, 1995.

MISHRA, V.K.; TEMELLI, F.; OORAIKUL, B. Extraction and purification of ω -3 fatty acids with and emphasis on supercritical fluid extraction-A review. **Food Research International**, v. 26, p 217-226, 1993.

NOBRE, B.; MARCELO, F.; PASSOS, R.; BEIRÃO, L.; PALAVRA, A.; GOUVEIA, L.; MENDES, R. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research Technology**, v. 223, p. 787–790, 2006.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF **AOAC** INTERNATIONAL., Current Through Revision 1, 2006.

OLSEN, R.L.; JACOBSEN, T. Characterization of flash-dried shrimp processing waste. **Journal of Marine Biotechnology**, v. 3, p. 208–209, 1995.

QUISPE-CONDORI S. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas de extração supercrítica de produtos naturais: *Artemisia annua*, *Cordia verbenácea*, *Ocimum selloi* e *Foeniculum vulgare*. Campinas, 2005. 239 f. Tese

(Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

REVERCHON, E.; DE, MARCO I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 38, p. 146-166, 2006.

ROSA, P. T. V., PARAJO, J.C., DOMINGUEZ, H., MOURE, A., DIAZ-REINOSO, B., SMITH, R.L., MASAACKI, TOYOMIZU, JR., FLORUSSE, L. J., PETERS, C. J., GOTO ,M., LUCAS, S.. MEIRELES M.A.M. Supercritical and Pressurized Fluid Extraction Applied to the Food Industry. In: Extracting Bioactive Compounds for Food products, Theory and Aplications. Editor M.A.A Meireles. CRC Press, 2008.

SACHINDRA, N.M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N.S. Carotenoids in crabs from marine and fresh waters of India. **Lebens Wiss und-Technol**, v. 38, p. 221–225, 2005

SAHENA, F.; ZAIDUL, I.S.M.; JINAP, S., KARIM, A.A.; ABBAS, K.A.; NORULAINI, N.A.N.; OMAR, A.K.M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review, **Journal of Food Engineering**, v. 95, p. 240–253, 2009.

SHAHIDI, F.; BROWN, J.A. Carotenoid Pigments in Seafoods and Aquaculture. **Critical Reviews in Food Science**. v. 38, n.1, p. 1–67, 1998.

SHI, J; GAURI, M.; KIM, E.; XUE, S. J. Solubility of carotenoids in Supercritical CO₂. **Food Reviews International**, v. 23, p. 341–371, 2007.

STATISTICA® 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK 74104, EUA)

TANAKA, Y.; OHKUBO, T. Extraction of lipids from Salmon Roe with Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of oleo Science**, v. 52, n. 6, p. 295-301, 2003.

TANAKA, Y.; SAKAKI, I.; OHKUBO, T. Extraction of phospholipids from Salmon Roe with supercritical carbon dioxide and an entrainer. **Journal of Oleo Science**, v. 53, n. 9, p. 417-424, 2004.

YAMAGUCHI, K.; MURAKAMI, M.; NAKANO, H.; KONOSU, S.; KOKURA, T.; YAMAMOTO, H.; KOSAKA, M.; HATA, K. Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic krill. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 34, n. 5, p. 904–907, 1986.

YOUN, H-S; ROH, M-K.; WEBER, A., WILKINSON, G.T.; CHUN B.S. Solubility of astaxanthin in supercritical carbon dioxide. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 24, n. 5, p. 831-834, 2007.

5. EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA EMPREGANDO ETANOL COMO CO-SOLVENTE.

5.1 Resumo

De acordo com os resultados obtidos, a extração com CO₂ supercrítico mostrou-se uma técnica adequada para a obtenção de extratos concentrados em lipídeos ricos em ácidos graxos ω -3 e carotenóides, a partir de resíduos de camarão-rosa. No entanto, as porcentagens de recuperação tanto de lipídeos quanto de astaxantina apresentaram valores máximos de 46 e 39%, respectivamente, quando usado somente CO₂ como solvente. No presente capítulo, foi estudado o efeito do uso de álcool etílico como co-solvente sobre os rendimentos de extração de lipídeos e astaxantina, a concentração de astaxantina e no teor de ácidos graxos eicosapentanoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) do extrato. Depois de identificar a condição de máximo rendimento de extração (300 bar e 50 °C), como foi reportado previamente, foram realizadas extrações com etanol visando à obtenção de uma condição onde o extrato seja rico em ácidos graxos ω -3 e astaxantina. Foram utilizadas relações em massa de 5, 10 e 15 % de etanol na mistura solvente com dióxido de carbono. Os resultados mostraram que o rendimento de extração de lipídeos aumenta drasticamente com o aumento da quantidade de etanol na mistura de solvente extrativo. Por sua vez, o rendimento de extração de astaxantina apresentou um comportamento similar, atingindo valores de recuperação de 65%, quando usada a máxima relação de co-solvente proposta, indicando uma importante melhora da sua solubilidade com a mudança da polaridade do solvente de extração. A concentração de ácidos graxos ω -3 no extrato, especificamente EPA e DHA, mostraram um aumento de 53,9 % e de 72,5 %, respectivamente, com o uso de apenas 5 % (m/m) de etanol. No entanto, a máxima recuperação foi atingida com o uso de 15 % de etanol, obtendo uma recuperação de 98,2 % para EPA e 82,7 % para DHA com relação à extração feita com Soxhlet.

5.2 Material e Métodos

O estudo de extração supercrítica empregando co-solvente foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Supercrítica: Extração, Fracionamento e Identificação de extratos vegetais - (LASEFI) com a colaboração do Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA-UNICAMP.

5.2.1 Material

Foi empregada a amostra de resíduo de camarão-rosa, acondicionada de acordo com o item 4.2.3 do Capítulo 4. A amostra foi mantida sob refrigeração a -10°C, antes da realização das extrações.

5.2.2 Solventes usados na extração supercrítica

Foi utilizado dióxido de carbono da empresa White Martins (PRAXAIR INC., Campinas, SP) com pureza de 99% e como co-solvente, álcool etílico absoluto/ACS (99.5%) fornecido por ECIBRA® Reagentes Analíticos (São Paulo, SP).

5.2.3 Extração supercrítica.

Com o intuito de estudar a influencia do co-solvente sobre a extração supercrítica, foram realizados três ensaios em duplicata, mantendo fixa a pressão e a temperatura, mas variando a porcentagem de co-solvente empregado, conforme descrito na Tabela 5.1. A massa de CO₂ (500 ± 1 g) e a quantidade de amostra ($7,00 \pm 0,02$ g) e, portanto a relação massa de solvente/matéria prima (S/F) foi mantida constante (71,43) conforme às magnitudes empregadas no Capítulo 4. A vazão de CO₂ foi dobrada (3,0 L/min), sendo o tempo de extração de 100 min. As vazões de etanol foram 0,334, 0,705 e 1,12 mL/min.,

respectivamente. As condições selecionadas para os ensaios foram aquelas donde apresentou-se o máximo rendimento de extração de lipídeos (300 bar e 50 °C), visando analisar a influência da adição de etanol na mistura extrativa, sobre a extração de astaxantina e extração de ácidos graxos ω -3.

Tabela 5.1.- Condições experimentais usadas nas extrações supercríticas empregando co-solvente

Temperatura (°C)	Pressão (Bar)	Co-solvente (m/m) %
50	300	5
50	300	10
50	300	15

5.2.3.1 Unidade experimental

As extrações supercríticas empregando co-solvente foram realizadas em uma unidade experimental conforme esquematizado na Figura 5.1.

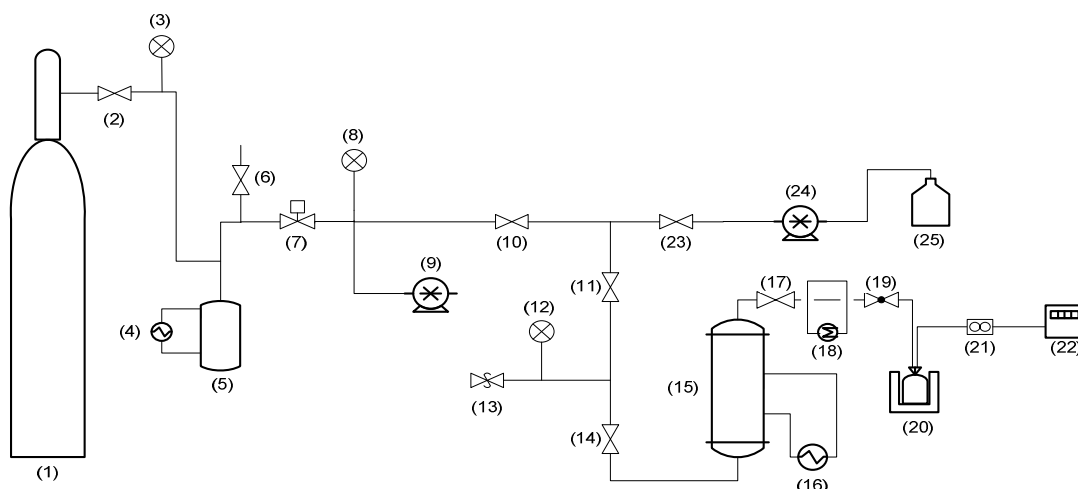


Figura 5.1.- Diagrama da unidade experimental para extração supercrítica empregando co-solvente – LASEFI/DEA- FEA-UNICAMP

- Cilindro sifonado com CO₂ (1);

- Válvulas de bloqueio, *Autoclave Engineers* (**2, 6, 10, 11, 14, 17, 23**);
- Manômetro tipo Bourdon, *Record* (**3, 8, 12**);
- Banho de refrigeração ultratermostatizado MA-184, *MARCONI* (Brasil) (**4**);
- Trocador de calor, *Suprilab* (Brasil) (**5**);
- Válvula de alta pressão, (Back pressure regulator), Modelo **26-1700**. Pressão Máxima: 10000 psi. *TESCOM* (EUA) (**7**);
- Bomba pneumática para alta pressão, Modelo PP111. Pressão Máxima: 13000 psi. *PALM*, Brasil (**9**);
- Válvula de segurança, *Swagelok Fluid System Technology* (Brasil) (**13**);
- Extrator de aço inox AISI 316, 300 mL, encamisado – *Suprilab* (Brasil) (**15**);
- Banho termostatizado, *Polyscience Modelo 9510*, EUA (**16**);
- Aquecedor elétrico para válvulas (**17**) e (**19**), *MARCONI* (Brasil) (**18**);
- Válvula micrométrica, *Autoclave Engineers* (**19**);
- Coletor de extrato, *frasco âmbar tipo penicilina de 100 mL, diâmetro de boca de 20 mm, lacrado* (**20**);
- Medidor de vazão, *Flow – Cole Parmer Instrument Company* (**21**);
- Totalizador de volume (*Indústria Brasileira*) (**22**);
- Bomba de alta pressão, Thermo Separation Products, Constametric 3200 P/F, EUA. (**24**);
- Estoque de co-solvente (**25**).

5.2.3.2 Procedimento de extração

Com antecipação à realização das extrações foram acondicionados os banhos termostatizados (**4**) e (**16**), o primeiro deles a uma temperatura de -10°C, com o intuito de mudar o CO₂ da fase gasosa para a fase líquida e o segundo a uma temperatura de 50 °C, este último circulando na camisa do extrator empregado para manter a temperatura de operação constante. O resíduo do camarão-rosa foi empacotado em uma célula de nylon de 50 mL e completado o

volume com perolas de vidro de 5 mm. A célula foi disposta dentro do extrator de tal forma, que a mistura de solventes penetrou inicialmente nas perolas de vidro e posteriormente no material a ser extraído, abandonando em seguida o extrator. Após atingir a temperatura nos banhos **(4)** e **(16)**, passou-se o CO₂ para o trocador de calor **(5)** e conseqüentemente para a bomba pneumática de alta pressão **(9)**. Posteriormente, foi pressurizado o extrator com as válvulas **(10)**, **(11)** e **(14)** abertas, no entanto fechando a válvula de alta pressão **(7)**, até atingir a pressão de 300 bar, a qual foi medida nos manômetros Bourdon **(8)** e **(12)**. Depois de alcançada a condição de pressão, o sistema foi mantido num período estático de 20 min, para garantir a estabilização das condições experimentais e provocar um maior contato entre o resíduo e o solvente supercrítico. Após o tempo de estabilização, inicia-se a extração, ligando a bomba dosificadora de etanol **(24)** e acondicionando-a na vazão requerida. Em seguida abriu-se a válvula **(23)** para dar passo à mistura de CO₂ e etanol, para ser escoada através do leito por um tempo de 100 minutos.

Durante o processo de extração, a pressão foi controlada e mantida constante pela bomba pneumática **(9)**. A vazão de solventes foi controlada manualmente através das válvulas **(17)** e **(19)**. O CO₂ foi conduzido e quantificado no medidor de vazão **(21)**, e o volume usado na extração foi medido em um totalizador **(22)**. Assim, coletou-se o extrato junto com o etanol, no frasco coletor **(20)** o qual foi previamente pesado, e mantido a temperatura de refrigeração (5°C) durante a extração, para evitar a oxidação dos componentes extraídos.

Logo de concluída a extração, foi despressurizado o extrator e lavada a tubulação com n-hexano (98,5%, Lote 115744), com auxílio de uma seringa, com o fim de recuperar o extrato que poderia ter ficado retido na tubulação. Desta forma, a quantidade de extrato obtida reporta-se como a soma do extrato obtido na extração, a despressurização e a lavagem da tubulação. As amostras foram mantidas sob refrigeração (-20°C) até a realização das análises posteriores.

5.2.4 Cálculo de rendimento de extração e recuperação de óleo

Após cada extração, o álcool etílico foi evaporado por meio evaporador rotativo (MARCONI, MA-120, São Paulo) a 40°C e -25 polegadas de Hg. Em seguida, o extrato foi seco em uma estufa com vácuo (Estufa a vácuo, MARCONI, MA 030/12, São Paulo), em idênticas condições da rotoevaporação e com fluxo constante de nitrogênio comercial (P-4631, WHITE MARTINS, PRAXAIR INC. Campinas, SP). O frasco coletor foi seco até peso constante e armazenado sob refrigeração a -10°C. Foi calculado o rendimento global de extração de acordo à Equação 4.4. A porcentagem de recuperação de óleo está referida à relação do conteúdo obtido na extração supercrítica e o presente na amostra inicial, de acordo à Equação 4.7, como foi descrito no item 4.2.14.

5.2.5 Cálculo de rendimento de extração e recuperação de astaxantina

A quantificação de carotenóides como astaxantina foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.15.1. O seu rendimento de extração foi calculado de acordo à Equação 4.5 e a concentração de astaxantina no extrato mediante a Equação 4.6. A porcentagem de recuperação de astaxantina está referida à relação do conteúdo obtido na extração supercrítica e o presente na amostra inicial, de acordo à Equação 4.8, como foi descrito no item 4.2.14.

5.2.6 Composição em ácidos graxos no extrato

Posteriormente à quantificação dos carotenóides os extratos concentrados em n-hexano foram evaporados e secos sob atmosfera inerte de nitrogênio até peso constante. Para a determinação dos ácidos graxos seguiu-se o método descrito em 3.2.3.5. As análises foram feitos em duplicata.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Efeito do etanol sobre o rendimento de extração de óleo

Resultados prévios sugeriram que o maior rendimento de extração de óleo a partir de resíduos de camarão-rosa foi obtido nas condições de 300 bar e 50°C, com valor médio de 2.21% b.s. Com o intuito de melhorar o rendimento nesta condição, foi estudado o efeito do etanol sobre o rendimento de extração de óleo e astaxantina. Os resultados obtidos são apresentados na figura 5.2. Os dados apresentados para 0% (m/m) de etanol nesta figura correspondem aos ensaios, 9, 10 e 11 do planejamento experimental DDCR feito no Capítulo 4.

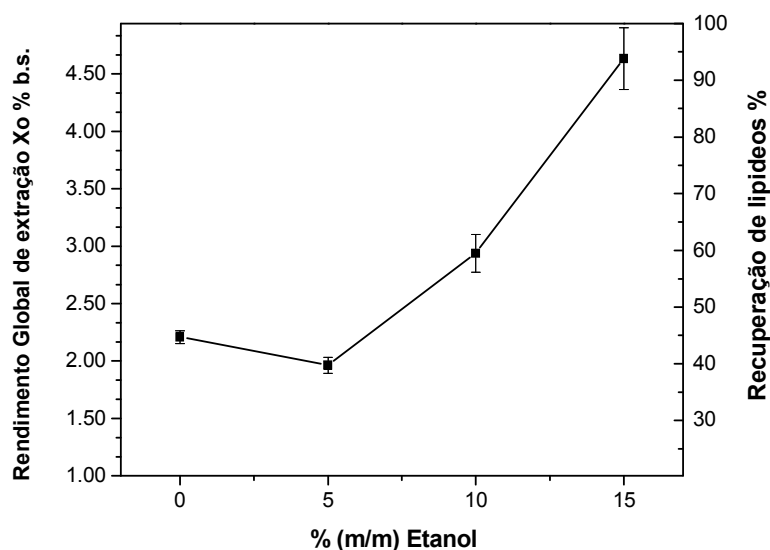


Figura 5.2.- Efeito do co-solvente sobre o rendimento de extração e a recuperação de óleo. Condições de extração: 300 bar, 50 °C.

(Cada resultado representa a média $\pm$ desvio padrão)

Em geral, o rendimento de extração mostrou um incremento com o acréscimo na porcentagem de etanol. Na extração que foi realizada com 5% de etanol em CO₂, o rendimento de extração apresentou uma queda de 11,1% com relação à extração realizada sem co-solvente, no entanto atingiu uma recuperação

de 40%. Já as extrações com 10 e 15% de etanol, apresentaram uma recuperação de lipídeos de um aumento no rendimento em média de 39,7% e 59,48%, respectivamente. Deste modo, um aumento no rendimento global de extração de 109,7% foi alcançado no incremento de 0% para 15% de co-solvente, atingindo uma máxima porcentagem de recuperação média de 93,8 % com relação aos lipídeos extraídos pela metodologia modificada de Bligh e Dyer (MANIRAKIZA P., et. al., 2001), a qual é considerada como a máxima que pode ser extraída. Como foi discutido no Capítulo 3, este aumento no rendimento de extração é devido à mudança na polaridade do CO₂ pela adição do co-solvente, fazendo solúveis compostos polares tais como fosfolipídios e glicolipídeos, que não podem ser extraídos apenas pelo CO₂. A extração de lipídeos a partir do resíduo de camarão usando n-hexano como solvente mostrou um conteúdo de lipídeos de somente 3,43% (b.s.), enquanto que a extração com metodologia de Bligh e Dyer mostrou um teor de lipídeos totais de 4,94 % (b.s.) A diferença deve-se possivelmente ao uso de metanol, no caso da extração com a metodologia de Bligh e Dyer, faz que compostos deste caráter polar, sejam extraídos.

Resultados similares foram encontrados em alguns trabalhos reportados na literatura. Tanaka et al. (2004) no estudo da eficiência do uso de SC-CO₂ e etanol na extração de lipídeos de ovas de salmão nas condições de 177 bar e 33°C. Neste estudo foi reportado que 39% dos lipídeos foram extraídos sem co-solvente, no entanto, quando a extração foi realizada com 10, 15 e 20% de etanol foi atingida uma recuperação de lipídeos de mais de 75%. Hardardottir e Kinsella (1988) reportaram que a adição de etanol melhora a solubilidade dos lipídeos em CO₂ supercrítico. Assim, nas condições de 275 bar e 40 °C, foram extraídos 78 % dos lipídeos quando não foi usado etanol como co-solvente e 97 % quando utilizado 10 % (m/m) na mistura solvente. Estes pesquisadores afirmam que o etanol ajuda a dissociar os complexos de proteína e fosfolipídios, ficando estes últimos disponíveis para serem extraídos. De tal modo, o SC-CO₂ extrai preferivelmente os triglicérides, em quanto o SC-CO₂/Etanol extrai ambos,

triglicerídeos e fosfolipídios. Kang et al. (2005) encontraram na extração supercrítica de óleo a partir de subprodutos de lula, que o uso de 1,5% m/m de etanol nas condições de 17,2 MPa e 45°C, aumentou o rendimento de extração de óleo de 45 % a 60%, com relação à extração feita sem co-solvente. Também foi reportado que um aumento na pressão de 138 a 172 bar na temperatura de 45 °C, teve um aumento na recuperação de óleo de 13 a 45 %.

5.3.2 Efeito do etanol sobre o rendimento de extração de astaxantina.

Como foi mostrado no Capítulo 3, a relativa baixa solubilidade da astaxantina em SC-CO₂ implica o uso de altas pressões para obter apreciáveis rendimentos de extração destes carotenoides. No entanto, segundo vários autores (MACHMUDAH et. al., 2006, NOBRE et.al. 2006, LIM et.al., 2002) o uso de co-solventes polares aumenta a solubilidade dos carotenóides no meio supercrítico. A quantidade de astaxantina extraída usando dióxido de carbono supercrítico com e sem etanol é comparada, e apresentada na figura 5.3.

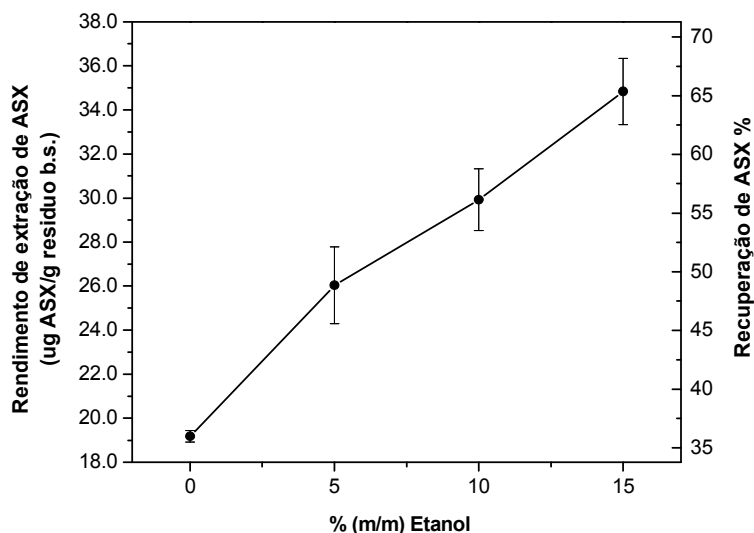


Figura 5.3.- Efeito do co-solvente sobre o rendimento de extração e a recuperação de astaxantina. Condições de extração: 300bar, 50°C. Cada resultado representa a média $\pm$ desvio padrão.

Nota-se que a adição de etanol apresentou um efeito importante no aumento da extração de astaxantina e, portanto, na sua recuperação com relação ao conteúdo no resíduo inicial. O rendimento de extração de astaxantina aumentou de 26,03 para 34,83 µg ASX/g de resíduo seco, quando a porcentagem de etanol foi aumentada de 5 a 15 % (m/m). O máximo rendimento de extração foi atingido quando empregado a maior relação de mistura de etanol e SC-CO₂ (15:85 m/m), e destaca-se como o rendimento de extração aumenta em 74,6% com relação à extração feita sem co-solvente.

O maior rendimento de extração de astaxantina obtido nos resultados prévios (sem uso de co-solvente) foi de 20,72 µg ASX/g de resíduo seco, nas condições de 370 bar e 43 °C. No entanto, com o uso de pressões desta magnitude não foi possível atingir os rendimentos alcançados com o uso do co-solvente. Deste modo, o acréscimo do rendimento de extração pelo uso de etanol modificador pode ser devido a dois efeitos: (a) o incremento da solubilidade da astaxantina e os outros carotenóides no solvente supercrítico (CO₂+Etanol) devido ao caráter ligeiramente polar deste tipo de moléculas, permitindo uma fácil formação de ligações hidrogênio com o etanol presente na corrente de CO₂ e, (b) a expansão dos poros da matriz, facilitando a liberação dos pigmentos (NOBRE et al., 2006). Em termos de rendimento de extração de astaxantina e de recuperação da mesma na matriz, a extração com acetona e a extração supercrítica com co-solvente, especificamente na relação de 15% de etanol na mistura, apresentaram resultados semelhantes, com a vantagem de que a extração supercrítica é um processo limpo e o etanol é um solvente considerado como seguro (Generally Recognized As Safe).

Na pesquisa realizada por Shi e colaboradores (2009) foi avaliado o efeito de etanol como modificador na extração supercrítica de licopeno a partir de casca de tomate. Nesse estudo achou-se que nas condições de 350 bar e 75 °C, o rendimento de extração de licopeno aumento 138 % quando foi acrescida a

porcentagem de etanol de 0 % a 15 %, na mistura CO₂ + etanol. Nobre et al., (2006) no estudo da extração supercrítica de astaxantina e outros carotenóides, a partir da microalga *Hematococcus pluvialis* reportaram que a mais alta recuperação de carotenóides (92 %) foi alcançada nas condições de 300 bar e 60 °C, usando 10 % (m/m) como co-solvente. O uso de co-solvente teve uma melhora no rendimento de extração de 25 %. Por sua vez, Shi e colaboradores (2010) mostraram que a adição de 10 % de etanol nas condições de 70°C e 350 bar, na extração de carotenóides a partir da abóbora *Curcubita moschata*, incrementou 1.8 vezes maior com relação à extração sem co-solvente.

Outro fator que merece destaque nos resultados obtidos neste trabalho é a concentração de astaxantina por grama de extrato, a qual apresentou seu máximo valor quando foi usado 5%(m/m) de etanol, obtendo um valor médio de 1377,39 ± 41,82 µg ASX/g extrato, como mostrado na Figura 5.4.

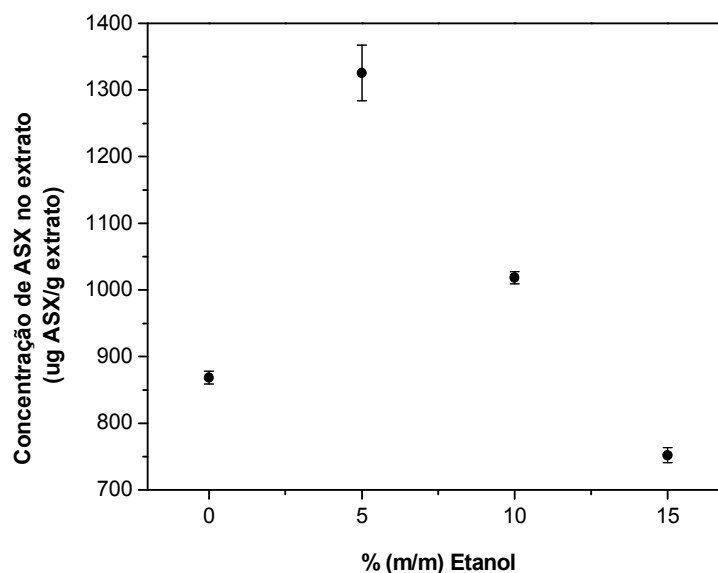


Figura 5.4.- Efeito do co-solvente sobre a concentração de astaxantina no extrato.

Condições de extração: 300bar, 50°C.

(Cada resultado representa a media ± desvio padrão)

Nesta condição foi encontrada a menor quantidade de extrato (menor rendimento global de extração) obtido em todas as condições exploradas e, portanto o extrato pode concentrar em maior quantidade os carotenóides. Na extração com solvente orgânico (mistura de IPA e n-hexano) obteve-se uma concentração de carotenóides totais como astaxantina de $1084 \pm 42 \mu\text{g/g}$ de óleo, valor que é superado pela extração com co-solvente.

O rendimento de extração de astaxantina aumentou consideravelmente após o uso de 5 % de etanol, onde a sua concentração no extrato teve uma queda de 23,15 % e 43,27 %, para 10 e 15 % (m/m) de co-solvente. Isto pode ser explicado pelo considerável aumento no rendimento de extração de óleo com o aumento da porcentagem de co-solvente, o que faz extrair compostos polares de tipo polar e diminuir a concentração de astaxantina no extrato, mesmo que o rendimento deste carotenóide aumente.

5.3.3 Efeito do etanol sobre o perfil de ácidos graxos no extrato

Na tabela 5.2 apresentam-se a composição de ácidos graxos nos extratos obtidos na extração supercrítica usando etanol como modificador.

Os resultados indicam que o conteúdo de ácidos graxos saturados diminui com o aumento da porcentagem do álcool etílico na mistura de solvente extrativo. Em compensação e contrário a esse fenômeno, o conteúdo de ácidos graxos insaturados aumenta com a quantidade de co-solvente usado, representando mais de 60 % dos ácidos graxos totais quando foi usada a relação 15:85 (m/m) (Etanol: SC-CO₂).

Tabela 5.2.- Composição de ácidos graxos %(m/m) dos lipídeos extraídos a partir de camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) usando SC-CO₂ e etanol como co-solvente.

Condições de extração: 300 bar, 50 °C

	ACIDO GRAXO	C-0%	C-5%	C-10%	C-15%	Soxhlet*
C12:0	Láurico	0,62	0,50	0,36	0,37	0,16
C14:0	Mirístico	3,91	3,42	2,62	2,62	1,96
C15:0	Pentadecanóico	1,90	1,68	1,47	1,46	1,19
C16:0	Palmitico	21,95	19,61	18,20	18,26	16,17
C16:1	Palmitoléico	7,51	6,46	6,13	6,21	5,20
C17:0	Margárico	2,43	2,27	2,19	2,21	2,23
C17:1	Margarolêico	1,04	0,99	1,18	1,31	0,98
C18:0	Estearico	8,85	8,29	7,80	7,89	9,40
C18:1	Elaídico	0,96	1,08	0,58	0,79	0,49
Trans						
C18:1	Oléico	16,17	14,91	16,65	15,65	16,85
C18:2	Linoelaídico	0,28	0,29	0,26	0,26	0,19
Trans						
C18:2	Linoléico	2,24	2,47	2,52	2,36	2,00
C18:3	Translinolênico	0,91	1,38	1,24	1,25	0,56
Trans						
C18:3 ω-3	Linolênico	0,40	0,50	0,51	0,52	0,43
C18:4 ω-3	Estearidônico	0,17	0,26	0,25	0,26	0,16
C20:0	Araquídico	0,87	0,90	0,74	0,75	0,70
C20:1	Gadoléico	1,26	1,18	1,07	1,08	3,25
C20:4	Araquidônico	3,31	4,48	5,15	5,45	5,81
C22:0	Behênico	0,58	0,61	0,53	0,54	-
C20:5 ω-3	Eicosapentanoico – EPA	5,91	9,10	11,04	11,48	11,69
C22:1	Erúcico	0,25	0,32	0,25	0,31	-
C24:0	Lignocérico	0,16	0,25	0,24	0,24	0,50
C22:5 ω-3	Decosapentanoico	0,92	1,33	1,42	1,46	1,51
C22:6 ω-3	Docosahexaenóico – DHA	4,29	7,40	9,59	10,12	12,24
NI	Não Identificado	13,06	10,32	8,01	7,15	6,33
	Total ω-3	11,69	18,59	22,81	23,84	26,03
	SAT (%)	41,27	37,53	34,15	34,34	32,31
	INSAT (%)	45,62	52,15	57,84	58,51	61,36
	MONO(%)	27,19	24,94	25,86	25,35	26,77
	POLI(%)	18,43	27,21	31,98	33,16	34,59
	SAT/INSAT	0,905	0,720	0,590	0,587	0,527
	SAT/POLI	0,447	0,725	0,936	0,966	1,071
	EPA/DHA	1,378	1,230	1,151	1,134	0,955

C-0%, Extração sem co-solvente, C-5%, Extração com 5% (m/m) etanol, C-10%, Extração com 10% (m/m) etanol, C-15%, Extração com 15%(m/m) etanol. * Lipídeos extraídos a partir usando o método Soxhlet. SAT, Saturado; INSAT, insaturado; MONO, monoinsaturado; POLI, poliinsaturado.

Não houve evidência da seletividade de extração de ácidos graxos monoinsaturados, os quais mantiveram seus teores constantes a diferentes relações de co-solvente. Quanto à relação de ácidos graxos saturados e insaturados, teve um decréscimo significativo até proporções de co-solvente de 10% (m/m) etanol, indicando que não precisam ser usadas maiores quantidades de etanol para melhorar em grande medida a solubilidade dos ácidos insaturados no meio da extração.

O efeito do co-solvente sobre o teor de ácidos graxos ω -3 foi bastante significativo. A porcentagem de recuperação destes ácidos usando só SC-CO₂ como solvente foi de 44,9 %, enquanto com o uso da máxima porcentagem de etanol proposta, extraiu-se 91,6 % de este tipo de ácidos.

De acordo a este comportamento, a extração dos ácidos Eicosapentanóico (EPA) e Docosahexaenóico (DHA) apresentou uma melhor recuperação com o aumento na relação etanol/CO₂. Os resultados prévios das extrações realizadas nas condições de 300 bar e 50 °C sem o uso de co-solvente mostraram uma recuperação de EPA e DHA, de 50,5 % e 35,05 %, respectivamente. Entretanto, o uso de apenas 5 % (m/m) de etanol, provocou um aumento de 53,9 % na concentração do EPA e de 72,5 % para DHA no extrato, com relação ao uso de 0 % (m/m) de etanol. Também, encontrou-se que um aumento no uso de co-solvente de 10 para 15% (m/m) não apresentou uma tendência tão importante, pois o aumento foi somente de 4,0 % para EPA e 5,5 % para DHA.

Na Figura 5.5, é apresentado o efeito do co-solvente na recuperação destes ácidos graxos. Nota-se como o uso de 15 % de etanol, atinge os melhores resultados com recuperações de 98,2 % e 82,7 %, para EPA e DHA, respectivamente, indicando a importante melhora da sua solubilidade com a mudança da polaridade do solvente de extração.

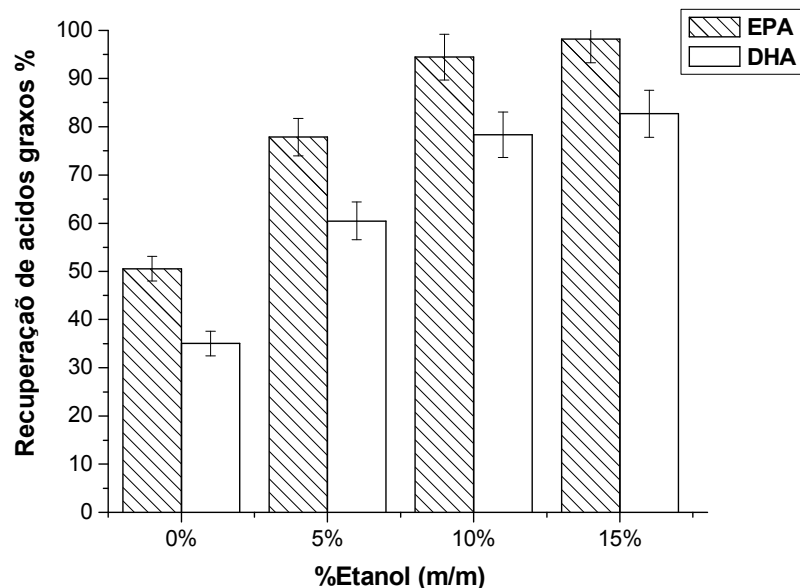


Figura 5.5.- Efeito do co-solvente na recuperação dos ácidos Eicosapentaenóico (EPA) e Docosahexaenóico (DHA). Condições de extração: 300bar, 50°C. (Cada resultado representa a media $\pm$ desvio padrão).

Tanaka e colaboradores (2004) afirmam que quando a extração de lipídeos de ovas de salmão foi desenvolvida com 5 % de etanol, aproximadamente 80 % dos triacilglicerois foram recuperados. Já, as extrações realizadas com misturas de 20, 15 e 20 % de etanol atingiram recuperações acima de 90 %.

5.4 Conclusões.

O rendimento de extração de lipídeos aumenta consideravelmente com o incremento da quantidade de etanol na mistura de solvente extrativo. Foi alcançado um aumento no rendimento global de extração de 109%, quando foi incrementada a porcentagem de co-solvente de 0% a 15%, atingindo uma máxima de recuperação de óleo de 93,8 %.

A adição de etanol apresentou um efeito importante no aumento da extração de astaxantina. Foi atingido o máximo rendimento de extração quando empregado a maior relação de mistura de etanol e SC-CO₂ (15:85 m/m), com valor de 34,56 µg ASX/g de resíduo seco. Assim mesmo, a máxima recuperação foi alcançada nesta relação de mistura, sendo de 65,15 %

A concentração de astaxantina no extrato apresentou um máximo quando foi utilizada uma porcentagem de etanol de 5 % (m/m), superando a concentração obtida na extração com solvente orgânico (IPA+n-Hexano). Após esta relação de etanol na mistura solvente, a concentração teve uma queda de 23,15 % e de 43,27%, para as porcentagens de 10 e 15% (m/m), respectivamente. Esta queda pode ser explicada pelo significativo aumento do rendimento de extração, onde possivelmente mais compostos polares foram extraídos, aumentando assim a quantidade de extrato, o que faz diminuir a concentração de astaxantina mesmo que o seu rendimento de extração aumente com o acréscimo na quantidade de co-solvente.

Da mesma maneira, o aumento na quantidade de co-solvente apresentou um incremento na concentração de ácidos graxos ω -3. No entanto, o aumento de 10 a 15 % (m/m) não apresentou um incremento significativo na concentração. Por sua parte, os ácidos graxos insaturados apresentaram o comportamento contrário,

pois um aumento na quantidade usada de etanol na extração faz com que diminua notavelmente a sua concentração no extrato oleoso.

5.5 Referências Bibliográficas

HARDARDOTTIR, I.; KINSELLA, J.E. Extraction of lipid and cholesterol from fish muscle with supercritical fluids. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1656-1661, 1988.

KANG, K-Y.; AHN, D-H; WILKINSON, G.T.; CHUN, B-S. Extraction of Lipids and Cholesterol from Squid Oil with Supercritical Carbon Dioxide. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 3, p 399-405, 2005.

LIM, G-B.; LEE S-Y.; LEE, E-K.; HAAM S-J; KIM W-S. Separation of Astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction, **Biochemical Engineering Journal**, v.11, p. 181–187, 2002.

MACHMUDAH S.; SHOTIPRUK A.; GOTO M.; SASAKI M.; HIROSE T. Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Using Supercritical CO₂ and Ethanol as Entrainer. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, p. 3652-3657, 2006.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, n.1, p. 93 -100, 2001.

NOBRE B.; MARCELO F.; PASSOS R.; BEIRÃO L.; PALAVRA A.; GOUVEIA L.; MENDES R. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. **European Food Research Technology**, v. 223, p. 787–790, 2006.

SHI J.; YI C.; YE X.; XUE S.; JIANG Y.; MA Y.; LIU D. Effects of supercritical CO₂ fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p 39–44, 2010.

SHI, J.; YI, C.; XUE, S. J.; JIANG, Y., MA, Y.; LI, D. Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 431–436, 2009.

TANAKA, Y., SAKAKI, I., OHKUBO, T., Extraction of phospholipids from Salmon Roe with supercritical carbon dioxide and an entrainer. **Journal of Oleo Science**, v. 53, n. 9, p. 417-424, 2004.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Foram caracterizados os resíduos do camarão-rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) quanto a sua composição centesimal, mostrando-o como uma fonte importante de proteína e cinzas (minerais). O teor de lípideos presente nos resíduos (cabeça, casca e cauda) foi baixo (4,94% b.s.) com relação ao resíduo todo, embora foi maior com relação aos dados reportados de outros camarões desta espécie. Os ácidos graxos eicosapentanoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) foram encontrados em maior proporção dentro do grupo dos ácidos graxos insaturados ω -3 (24% m/m). O teor de carotenóides totais como astaxantina foi quantificado por meio de espectrofotometria e foram identificados como principais pigmentos, astaxantina livre, a astaxantina monoéster e a astaxantina diéster por meio de cromatografia de camada delgada (CCD).

O máximo conteúdo de astaxantina extraído do resíduo foi de 53 ± 2 μ g de ASX/g de resíduo b.s., quando extraído com uma mistura de álcool isopropílico e n-hexano em uma proporção de 40 a 60% (v/v). Este resultado encontrou-se semelhante ao reportado para o camarão *penaeus indicus* (43,9 μ g de ASX/g de resíduo b.u.) proveniente da Índia, quando usado uma mistura de álcool isopropílico e n-hexano (50: 50 (%v/v)).

A extração com SC-CO₂, mostrou que a temperatura e a pressão apresentaram efeitos pouco significativos sobre o rendimento global de extração (X_0 % b.s.), mantendo-se praticamente constante em todas as condições de extração estudadas. *O máximo rendimento global de extração (2,21% b.s.) foi atingido nas condições de 50 °C e 300 bar.* A porcentagem de recuperação de lípideos por extração supercrítica, quando comparada com a extração com n-hexano (metodologia amplamente usada na indústria de alimentos), atingiu valores entre 53 e 68%. Estes resultados foram concordantes com alguns estudos reportados na literatura.

A variável de resposta, rendimento de extração de astaxantina (μg de ASX/g de resíduo b.s.), mostrou-se dependente da densidade do solvente, nas condições onde o solvente apresentou maior densidade, conseguiu ser extraída a maior quantidade de carotenóides, predominando as temperaturas baixas. *O máximo rendimento de extração de astaxantina (20,71 μg de ASX/g de resíduo b.s.) foi atingido nas condições de 43 °C e 370 bar.* A porcentagem de recuperação com relação à máxima extração com solvente foi de 39%. Esta variável apresentou uma tendencia semelhante com a variável concentração de astaxantina no extrato e em condições de alta pressão (≥ 350 bar) e baixas temperaturas (40-50°C), foram obtidas valores de concentração similares aos reportados na extração de com IPA e n-hexano. *A máxima concentração de astaxantina no extrato (1074,4 μg de ASX/g extrato) foi atingido nas condições de 43 °C e 370 bar.* Ainda que a concentração é alta, não pode superar a obtida por meio do cultivo de *Phaffia rhodozyma* (8000 μg de ASX/g extrato) como reportado na literatura.

Observou-se uma diminuição na concentração dos ácidos graxos saturados com o aumento da pressão de extração e em contrapartida o teor de ácidos graxos insaturados como EPA e DHA, aumentam com esta condição. *A máxima recuperação destes ácidos poliinsaturados foi obtida a 300 bar e 60 °C.*

A adição de etanol como co-solvente confirmou um aumento do rendimento de extração de lipídeos e a concentração de ácidos graxos ω -3 no extrato. A máxima porcentagem de recuperação de lipídeos (93,8%) foi atingida quando foi empregada a maior relação de mistura de etanol e CO_2 (15:85 %m/m). Nesta mesma condição foram obtidos os maiores resultados de recuperação de EPA e DHA e carotenóides quantificados como astaxantina (65,15%). Estes resultados demonstraram que a extração supercrítica pode ser uma tecnologia competitiva com relação às já existentes.

Apesar disto, a adição de 10% de etanol na mistura solvente, mostra-se como a *melhor* condição de extração para a obtenção de extratos ricos em ácidos graxos ω -3 e astaxantina, quando os valores de rendimento de extração e a concentração destes compostos de interesse são avaliados em conjunto. Nesta condição, obteve-se um rendimento de extração medio de 2.96 g ext/100 g resíduo b.s, representando uma porcentagem de recuperação de 56%, um teor de EPA+DHA de 20,6% e uma concentração de astaxantina de 1018 μ g ASX/g extrato.

7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.

Estudar o uso da secagem convectiva como alternativa de pretratamento da matéria-prima, com o intuito de avaliar a influencia da temperatura de secagem, sobre as características e quantidade de extrato obtido, tanto na extração com solventes organicos quanto a extração supercrítica.

Realizar estudos de atividade antioxidante dos extratos obtidos pelas diferentes formas de extração estudadas, visando conhecer sua possível aplicação como suplemento nutraceutico.

Identificar e quantificar por outras tecnicas de analise os carotenóides presentes no extrato.

Avaliar se o resíduo disponível depois de extração de lipídeos e carotenóides pode ser utilizado para a preparação de quitina/quitosana, tendo assim uma abordagem integrada para utilização eficiente dos resíduos de camarão.

8. APÊNDICE

- APÊNDICE 8A.** CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CAROTENÓIDES TOTAIS COMO ASTAXANTINA
- APÊNDICE 8B.** GRANULOMETRIA DO RESÍDUO DE CAMARÃO-ROSA. Parâmetros utilizados no cálculo do diâmetro médio das partículas.
- APÊNDICE 8C.** CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE PRESSÃO E TEMPERATURA E SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS GLOBAIS PARA AS CURVAS DE CINÉTICA DE EXTRAÇÃO
- APÊNDICE 8D** CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE PRESSÃO E TEMPERATURA E SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS GLOBAIS PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2² (DCCR
- APÊNDICE 8E.** DADOS OBTIDOS DA VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL (T=40 °C, P= 400 BAR).
- APÊNDICE 8F.** VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL. COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%m/m) DOS LIPÍDEOS EXTRAÍDOS A PARTIR DE CAMARÃO-ROSA (*Farfantepenaeus paulensis*) USANDO SC-CO₂. CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO: 400 BAR, 40°C
- APÊNDICE 8G.** RENDIMENTOS DE EXTRAÇÃO DOS ENSAIOS EXPERIMENTAIS FEITOS COM CO-SOLVENTE
- APÊNDICE 8H.** FOTOGRAFIA DOS EXTRATOS OBTIDOS NAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.

APÊNDICE 8A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS COMO ASTAXANTINA

Tabela 8A.1. Dados para construção da curva de calibração.

ug ASX/mL	UA _{472nm}			Media 1	Media 2	Desv. Pad.
0,27	0,0516	0,0543	0,0534	0,0531		
	0,0558	0,0565	0,057	0,0564	0,0524	0,0045
	0,0474	0,0478	0,0476	0,0476		
0,684	0,1385	0,138	0,1385	0,1383		
	0,151	0,1497	0,1501	0,1503	0,1398	0,0099
	0,1309	0,1306	0,1306	0,1307		
1,368	0,3018	0,3027	0,3026	0,3024		
	0,2995	0,2998	0,3005	0,2999	0,2983	0,0051
	0,2917	0,2947	0,2915	0,2926		
2,053	0,4522	0,455	0,4558	0,4543	0,4673	0,0184
	0,4793	0,4805	0,4812	0,4803		
2,737	0,5782	0,5788	0,5793	0,5788		
	0,5631	0,5606	0,5606	0,5614	0,5748	0,0118
	0,584	0,5841	0,5841	0,5841		
3,421	0,7507	0,7547	0,7545	0,7533		
	0,7353	0,7405	0,7405	0,7388	0,7434	0,0086
	0,7385	0,7378	0,7378	0,7380		
4,105	0,9072	0,9041	0,9046	0,9053		
	0,8767	0,9220	0,9234	0,9074	0,8987	0,0132
	0,8766	0,8912	0,8828	0,8835		

[UA=Unidade de absorvancia]

APÊNDICE 8A- CONTINUAÇÃO

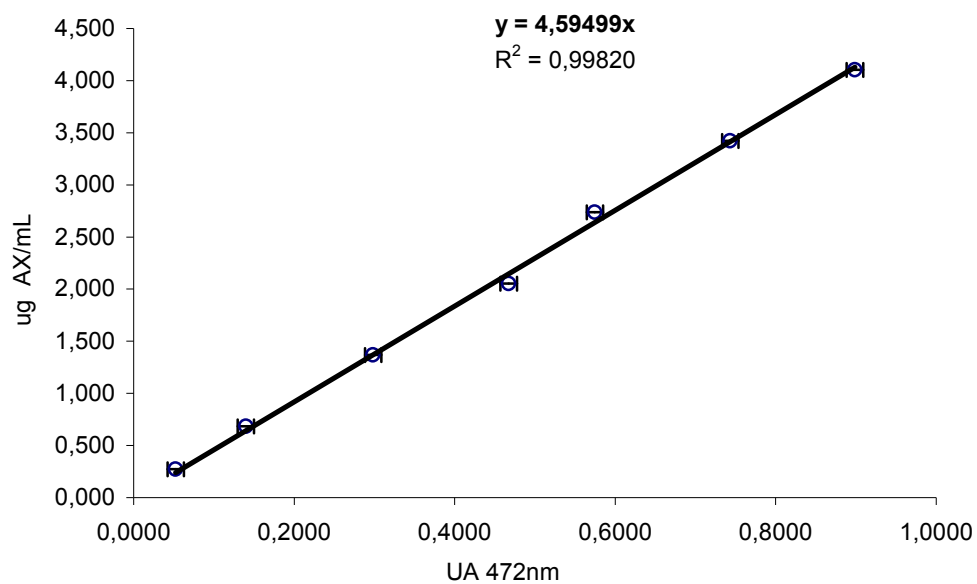


Figura 8A-1. Curva de calibração padrão para astaxantina (>93%), comprimento de onda 472 nm.

APÊNDICE 8B. GRANULOMETRIA DO RESIDUO DE CAMARÃO-ROSA.

Tabela 6B-1. Parâmetros utilizados no cálculo do diâmetro médio das partículas.

i	Mesh	d _i (mm)	d _{i+1} (mm)	(d _i *d _{i+1}) ^{0.5}	w _i (g)	w _i *log D _i	Distribuição (%)
14	16	1,000	2,000	1,414	0,0000	0,000	0,000
13	24	0,707	1,000	0,841	89,1829	-6,715	22,526
12	32	0,500	0,707	0,595	77,1499	-17,421	19,487
11	48	0,297	0,500	0,385	67,9451	-28,139	17,162
10	60	0,250	0,297	0,272	33,5626	-18,951	8,477
9	65	0,210	0,250	0,229	23,2727	-14,893	5,878
8	80	0,180	0,210	0,194	3,3356	-2,372	0,843
7	100	0,150	0,180	0,164	2,9996	-2,353	0,758
6	115	0,125	0,150	0,137	34,1037	-29,449	8,614
5	200	0,075	0,125	0,097	38,2825	-38,819	9,670
4	250	0,066	0,075	0,070	19,2600	-22,201	4,865
3	270	0,053	0,066	0,059	3,4027	-4,179	0,859
2	325	0,045	0,053	0,049	2,8447	-3,730	0,719
1	400	0,038	0,045	0,041	0,5617	-0,777	0,142
d_{gw} (mm)		0,331					

APÊNDICE 8C

Tabela 8C-1 - Condições operacionais de pressão e temperatura e seus respectivos rendimentos globais para as curvas de cinética de extração.

Ens	Temperatura (°C)	Pressão (Bar)	Densidade CO ₂ (kg/cm ³)	Tempo (min)	Massa de CO ₂ (g)	Massa Acumulada (g)	Rendimento global Extração (Xo % b.s)
1	43	230	851,42	20	49,8	0,0788	1,206
				40	99,7	0,1113	1,704
				60	149,5	0,1189	1,820
				90	224,2	0,1231	1,885
				120	299,0	0,1254	1,920
				160	398,6	0,1270	1,944
				200	498,3	0,1287	1,970
2	43	370	933,43	20	49,6	0,0971	1,457
				40	99,1	0,1214	1,822
				60	148,7	0,1267	1,901
				90	223,0	0,1285	1,928
				120	297,4	0,1328	1,993
				160	396,5	0,1357	2,036
				200	495,6	0,1386	2,080
3	57	230	781,01	20	50,1	0,0721	1,082
				40	100,1	0,1110	1,665
				60	150,2	0,1199	1,799
				90	225,3	0,1238	1,857
				120	300,4	0,1243	1,865
				160	400,5	0,1248	1,872
				200	500,6	0,1251	1,877
4	57	370	884,86	20	49,6	0,1061	1,565
				40	99,1	0,1274	1,880
				60	148,7	0,1321	1,949
				90	223,0	0,1346	1,986
				120	297,4	0,1354	1,998
				160	396,5	0,1364	2,012
				200	495,6	0,1386	2,045
5	40	300	910,13	20	49,1	0,0725	1,088
				40	98,2	0,1025	1,537
				60	147,2	0,1120	1,679

				90	220,9	0,1195	1,792
				120	294,5	0,1244	1,865
				160	392,6	0,1265	1,897
				200	490,8	0,1294	1,940
				20	49,4	0,0856	1,268
				40	98,8	0,1109	1,643
				60	148,2	0,1194	1,768
6	60	300	829,78	90	222,3	0,1260	1,866
				120	296,4	0,1305	1,933
				160	395,2	0,1318	1,952
				200	494,0	0,1326	1,964
				20	49,8	0,0638	0,953
				40	99,6	0,0959	1,433
				60	149,5	0,1075	1,606
7	50	200	785,03	90	224,2	0,1124	1,679
				120	298,9	0,1160	1,733
				160	398,6	0,1190	1,778
				200	498,2	0,1201	1,794
				20	49,7	0,0965	1,436
				40	99,3	0,1132	1,684
				60	149,0	0,1175	1,748
8	50	400	923,20	90	223,5	0,1198	1,782
				120	298,0	0,1208	1,797
				160	397,4	0,1222	1,818
				200	496,7	0,1245	1,852
				20	49,3	0,0853	1,301
				40	98,5	0,1087	1,657
				60	147,8	0,1158	1,766
9a	50	300	870,64	90	221,6	0,1203	1,834
				120	295,5	0,1241	1,892
				160	394,0	0,1262	1,924
				200	492,5	0,1291	1,968
				20	49,4	0,0931	1,374
				40	98,8	0,1182	1,745
				60	148,1	0,1271	1,876
9b	50	300	870,64	90	222,2	0,1312	1,937
				120	296,3	0,1339	1,976
				160	395,0	0,1364	2,013
				200	493,8	0,1389	2,050

APÊNDICE 8D

Tabela 8D-1. Condições operacionais de pressão e temperatura e seus respectivos rendimentos globais para o planejamento experimental 2² (DCCR)

Temperatura (°C)	Pressão (Bar)	Massa inicial amostra (g)	Massa extrato (g)	Rendimento global de extração Xo % b,s	UA (1)	UA (2)	Media UA	Rendimento de extração de ASX (ug/g resíduo b,s)	Concentração de ASX no extrato (ug/g extrato)
43	230	7,0412	0,1272	1,912	0,1784	0,1806	0,180	12,40	648,428
57	230	7,0881	0,1165	1,739	0,1628	0,1828	0,173	5,93	340,779
43	370	7,0516	0,1285	1,928	0,6169	0,5850	0,601	20,72	1074,459
57	370	7,0966	0,1345	2,006	0,5121	0,5382	0,525	17,99	897,048
40	300	7,0051	0,1301	1,965	0,5384	0,5884	0,563	19,55	994,934
60	300	7,0520	0,1341	2,012	0,4554	0,5038	0,480	16,53	821,684
50	200	7,1186	0,1294	1,924	0,0992	0,1024	0,101	6,89	357,940
50	400	7,0333	0,1158	1,742	0,5080	0,5135	0,511	17,66	1013,34
50	300	7,0172	0,1496	2,256	0,5610	0,5577	0,559	19,38	859,03
50	300	6,9938	0,1420	2,149	0,5428	0,5432	0,543	18,88	878,55
50	300	7,0128	0,1472	2,221	0,5466	0,5649	0,556	19,27	867,41

[UA= Unidade de absorbância]

APÊNDICE 8E – Dados obtidos da validação experimental (T=40 °C, P= 400 bar)

Massa amostra (g)	Massa de extrato (g)	Rendimento global de extração X_0 % b.s	Rendimento de extração de ASX (μg Astaxantina/ g residuo b.s.)	Concentração astaxantina (μg Astaxantina/ g extrato b.s.)
7,0935	0,1278	1,907	16,33	856,80
7,0460	0,1326	1,991	18,27	917,61
7,0525	0,1294	1,942	17,64	908,35

APÊNDICE 8F. Validação experimental. Composição de ácidos graxos (%m/m)
dos lipídeos extraídos a partir de camarão-rosa (*Farfantepenaeus Paulensis*)
usando SC-CO₂. Condições de extração: 400bar, 40°C

ACIDO GRAXO		400bar/40°C
C12:0	Láurico	0,49
C14:0	Mirístico	3,32
C15:0	Pentadecanóico	1,60
C16:0	Palmitico	18,91
C16:1	Palmitoléico	6,29
C17:0	Margárico	2,16
C17:1	Margarolêico	1,04
C18:0	Esteárico	7,86
C18:1 Trans	Elaídico	1,01
C18:1	Oléico	14,68
C18:2 Trans	Linoelaídico	0,27
C18:2	Linoléico	3,72
C18:3 Trans	Translinolênico	1,28
C18:3 ω-3	Linolênico	2,66
C18:4 ω-3	Estearidônico	0,25
C20:0	Araquídico	0,86
C20:1	Gadoléico	1,17
C20:4	Araquidônico	4,41
C22:0	Behênico	0,56
C20:5 ω-3	Eicosapentanóico – EPA	8,94
C22:1	Erúcico	0,17
C24:0	Lignocérico	0,17
C22:5 ω-3	Decosapentanóico	1,34
C22:6 ω-3	Docosaheptaenóico – DHA	7,35
NI	Não Identificado	9,49
EPA+DHA		16,29

APÊNDICE 8G - Rendimentos de extração dos ensaios experimentais feitos com co-solvente.

Co-solvente (m/m) %	Vol ETOH (ml)	Massa amostra (g)	Massa de extrato (g)	Rendimento de extração Xo (% b.s)	% Recuperação de óleo	Rendimento de extração de ASX (µg Astaxantina/ g resíduo b.s.)	% Recuperação de astaxantina.	Concentração astaxantina (µg Astaxantina/ g extrato)
0	-	7,0172	0,1496	2,256	45,67	18,88	36,36	859,027
0	-	6,9938	0,1420	2,149	43,49	19,38	35,41	878,549
0	-	7,0128	0,1472	2,221	44,96	19,27	36,15	867,414
5	33,41	7,0532	0,1341	2,012	40,73	27,26	51,15	1354,972
5	33,41	7,2875	0,1318	1,914	38,74	24,80	50,26	1295,761
10	70,53	7,0176	0,2026	3,055	61,84	30,92	58,01	1012,175
10	70,53	7,0642	0,1884	2,822	57,13	28,93	57,70	1025,039
15	112,03	7,0386	0,2956	4,444	89,96	33,77	58,27	759,920
15	112,03	7,0109	0,3196	4,824	97,65	35,89	67,34	744,015

APÊNDICE 8H – Fotografia dos extratos obtidos nas diferentes condições de extração.

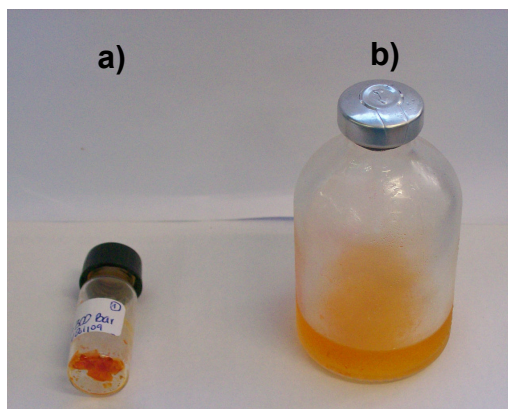


Figura 8H-1. Fotografia representativa dos extratos obtidos nas diferentes condições de extração supercrítica. a) extrato seco, b) extrato dissolvido em n-hexano.