



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

**EXTRAÇÃO E ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS COM
IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA E BIOLÓGICA
PROVENIENTE DO RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DE
CAMARÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dra. Sandra R.S. Ferreira
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

NATÁLIA MEZZOMO
Engenheiro de Alimentos (2006)
MSc. Engenharia de Alimentos (2008)

Florianópolis – SC
2012

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

M617e Mezzomo, Natália

Extração e encapsulamento de compostos com importância tecnológica e biológica proveniente do resíduo de processamento de camarão [tese] / Natália Mezzomo ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira. - Florianópolis, SC, 2012.

216 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de alimentos. 2. Carotenóides. 3. Astaxantina. 4. Antioxidantes. 5. Camarão rosa. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDU 663

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me orientar a escolher o melhor caminho para cada passo de minha vida.

Aos meus pais, Helena e Cleto, minha irmã Melissa, meus avós, Celestina, Gemira e Severino pelas orações, apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao meu esposo Fredy, pelo amor, compreensão, carinho e palavras de motivação sempre.

À minha orientadora Prof^{da}. Dra. Sandra R. S. Ferreira pela amizade, apoio, incentivo e contribuições para o desenvolvimento desta tese.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Maraschin pela ajuda nos ensaios e atenção disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Haiko Hense, ao Prof. Dr. Julian Martínez (FEA/Unicamp) e ao Prof. Dr. Marcelo Lanza pelas orientações científicas, técnicas e laboratoriais.

À Prof^{da} MSc. Maria Tereza Friedrich (CEPA/UPF) pelo auxílio nos ensaios.

À Profa. Rozangela C. Pedroza e a doutoranda Mirelle S. Farias pela imensa ajuda, idéias e disponibilidade de realizar os ensaios anti-obesidade e hipolipemiante.

A la catedrática María J. Cocero y al investigador Ángel Martín, por la receptibilidad en Valladolid y gran conocimiento divididos. Al Grupo de Procesos en Alta Presión por completo por acogerme tan amablemente.

Às amigas de pós-graduação e do LATESC pela ajuda e bons momentos compartilhados, em especial as queridas Daniela e Patrícia pela oportunidade de dividir uma rara e eterna amizade.

Às estagiárias de iniciação científica Renata e Laura pelo carinho e responsabilidade cedidos.

À Peixaria Nelson Santos (Mercado Público, Florianópolis/SC) pela doação da matéria-prima.

Ao PGEAL pelo apoio e suporte fornecidos para a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e evolução desta tese.

RESUMO

O processamento de camarão gera um resíduo formado pela cabeça e carapaça do crustáceo. Este resíduo apresenta um grande potencial para agregação de valor mediante a extração da fração carotenóidica da matéria-prima. O método de extração usado para a obtenção de compostos a partir de uma matéria-prima natural é crítico para a definição da qualidade do produto final. Desta forma, o objetivo deste trabalho é estudar o aproveitamento do resíduo de processamento de camarão rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) para a obtenção de extratos de alto valor agregado, avaliando a técnica de extração, atividade biológica dos extratos e o seu encapsulamento. A matéria-prima, obtida no mercado público de Florianópolis/SC/Brasil, foi submetida a diferentes pré-tratamentos como tratamento térmico, secagem e moagem, sendo que estes métodos combinados apresentaram a melhor recuperação da fração carotenóidica da matéria-prima. Subsequentemente, foi estudada a eficiência de extração de carotenóides de sistemas a baixa pressão. Como tecnologia alternativa de extração de carotenóides foi aplicada a extração supercrítica (ESC) nas condições de 313.15 e 333.15 K e de 100 a 300 bar, empregando CO₂ puro como solvente. Como modificadores do CO₂ foram utilizados hexano:isopropanol (50:50) e óleo de girassol (2 % e 5 %, m/m). A cinética e a modelagem da ESC foram avaliadas com diferentes vazões de CO₂ e umidades da matéria-prima. Os resultados foram avaliados quanto ao rendimento de extração, o perfil quali/quantitativo de carotenóides, o rendimento em astaxantina, o perfil espectrofotométrico UV-Visível e no infravermelho médio (FTIR), o perfil de ácidos graxos e as atividades antioxidante, anti-obesidade e hipolipemiante dos diferentes extratos. Finalmente, foi realizada a co-precipitação de astaxantina em polímeros por tecnologia supercrítica utilizando CO₂ como anti-solvente pelos métodos Anti-Solvente Supercrítico (SAS), onde foi investigado o efeito de variáveis do processo no tamanho, distribuição do tamanho e morfologia das partículas precipitadas, e SAS de emulsão (SFEE). A composição dos extratos obtidos a baixa pressão indicou a acetona e a solução hexano:isopropanol como os solventes de maior eficiência na extração de carotenóides. A eficiência da ESC de carotenóides aumentou com o aumento da massa específica do CO₂ e o maior rendimento em astaxantina foi a 333.15 K/300 bar, usando CO₂ puro. A análise de custos do processo sugere o emprego de um equipamento de 2 x 400 L e tempo de 25 min para um processo mais lucrativo. Maiores atividades antioxidantes foram obtidas para os

extratos alcoólico e cetônico, dentre os sistemas a baixa pressão. Os extratos apresentaram alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente ω -3 EPA e DHA, e de compostos fenólicos. O extrato ESC (333.15 K/300 bar) a 50 mg/kg.d apresentou os melhores efeitos anti-obesidade (79-84 %) e hipotrigliceremiante. Os extratos Soxhlet promoveram as maiores reduções nos níveis de colesterol sérico. A eficiência do encapsulamento do extrato em Pluronic F127 através de SAS foi de até 74 %. Nano-emulsões processadas por SFEE apresentaram o melhor desempenho de encapsulamento e o menor tamanho de partícula. Todas as partículas produzidas por SAS e SFEE apresentaram melhor preservação de cor quando comparadas com o extrato não processado.

PALAVRAS-CHAVE: carotenóides; astaxantina; cinética; capacidade antioxidante; atividade hipolipemiante; co-precipitação.

ABSTRACT

The processing of shrimp generates a waste formed by crustacean head and carapace. This residue presents a high potential for aggregating value by the extraction of carotenoidic fraction from this raw material. The extraction procedure applied to obtain compounds from natural raw materials defines the product quality. Therefore, the objective of this study is to evaluate the use of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing waste to obtain extracts with high aggregate value, comparing different extraction methods, biologic activity and encapsulation. The raw material was provided by a local market (Florianópolis/Brazil), and it was submitted to different pre-treatments, as heat treatment, drying and milling, being that the combination of all methods showed the best carotenoid recovery from raw material. Subsequently, it was studied the efficiency of carotenoid extraction of solvent systems. Alternatively, the supercritical fluid extraction (SFE) was applied as alternative technique on operational conditions of 313.15 and 333.15 K, and of 100 to 300 bar, using CO₂ as solvent. As CO₂ modifiers, it was applied hexane+isopropanol (50:50, v/v) and sunflower oil (2 % and 5 %, w/w). The kinetics and the modeling of the SFE curves were evaluated considering different solvent flow rates and raw material moisture content. The results were evaluated through the extraction yield, qualitative and quantitative carotenoid profile, astaxanthin yield, UV-Vis and infrared spectrophotometry profiles, fatty acid profile and antioxidant, anti-obesity and hypolipidemic activities of different extracts. Finally, the co-precipitation of astaxanthin in polymers through supercritical technology using CO₂ as anti-solvent was studied by the methods Supercritical Anti-Solvent (SAS), considering the effect of process variables on size, size distribution and morphology of precipitated particles, and and SAS from emulsion (SFEE). The composition of low pressure extracts indicated acetone and hexane+isopropanol (50:50) solution as the solvents with higher efficiency on carotenoid extraction. The SFE efficiency was optimized with the increasing of the CO₂ specific mass and the higher astaxanthin yield was obtained at 300 bar/333.15 K, using pure CO₂. The process costs results suggest that employing a 2x400 L unit during 25 min is the most lucrative process. Higher antioxidant activities were observed in alcoholic and cetonic extracts, among low pressure systems. The shrimp residue extracts showed higher content of polyunsaturated fatty acids, specially the ω -3 EPA and DHA, and phenolic compounds. The SFE

(333.15 K/300 bar) extract at 50 mg/kg.d showed the best anti-obesity (79-84 %) and hipotriglycerimiant effects. Soxhlet extracts promoted the highest reductions on serum cholesterol levels. The extract encapsulation efficiency in Pluronic F127 by means of SAS was up to 74 %. Nano-emulsion processed by SFEE presented the highest encapsulation performance and the lowest particle size. All particles produced showed better color preservation compared to the crude extract.

KEY-WORDS: carotenoids; astaxanthin; kinetics; antioxidant activity; hypolipidemic activity; co-precipitation.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs = absorvância/ <i>absorbance</i>	EY = <i>extraction yield</i>
Ac = acetona/ <i>acetone</i>	FER = etapa de extração
ANOVA = análise de variância/ <i>analysis of variance</i>	descrescente/ <i>falling extraction rate period</i>
ATP = adenosine trifosfato	FI = fração investimento/ <i>investment fraction</i>
ASES = sistema de extração de solvente em aerossol	FTIR = espectroscopia no IR com transformada de Fourier/ <i>mid-Fourier transform infrared spectroscopy</i>
BHA = <i>butylated hydroxytoluene</i>	GAS = gas anti-solvente
BHT = <i>butylated hydroxyanisole</i>	GRAS = <i>general recognized as safe solvent</i>
b_i = parâmetro ajustável do modelo de Martínez et al. (2003)	H = comprimento total do leito
CER = etapa constante de extração/ <i>constant extraction rate</i>	h = coordenada axial
CG-FID = <i>gas chromatography-flame ionization detector</i>	HDL- = <i>high density lipoprotein-</i>
CLAE = cromatografia gasosa de alta eficiência	HLB = balanço hidrofílico-lipofílico/ <i>hydrophilic-lipophilic balance</i>
CO ₂ = dióxido de carbono/ <i>carbon dioxide</i>	HPLC = <i>high performance liquid chromatography</i>
COL = custo de operadores/ <i>labor cost</i>	Hx = hexano/hexane
COM = custo de manufatura/ <i>manufacturing cost</i>	Hx:IPA = mistura de hexano+isopropanol (50:50)/ <i>hexane+isopropanol mixture (50:50)</i>
CRM = custo de material-prima/ <i>raw material cost</i>	IPA = isopropanol
CUT = custo de utilidades/ <i>utilities cost</i>	IR = infravermelho/ <i>infrared</i>
CWT = custo de tratamento de resíduos/ <i>waste treatment cost</i>	J(X,Y) = fluxo de transferência de massa interfacial
D _{AB} = difusividade do extrato no CO ₂ supercrítico/ <i>diffusivity of extract in the supercritical CO₂</i>	k_{yA} = coeficiente de transferência de massa na fase fluida/ <i>mass transfer coefficient in the fluid phase</i>
D _m = difusividade do soluto na matriz sólida/ <i>diffusivity</i>	k_{xA} = coeficiente de transferência de massa na fase sólida/ <i>mass transfer coefficient in the fluid phase</i>
d_p = diâmetro de partícula/ <i>particle diameter</i>	LATESC = Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica
DHA = ácido docosahexanóico/ <i>docosahexanoic acid</i>	LDL- = <i>low density lipoprotein-</i>
DSC = <i>differential scanning calorimetry</i>	m_{ext} = massa de extrato
DPPH = 1,1-difenil-2-picrilidrazina/ <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil</i>	m_i = massa inicial de amostra
DTGS = deuterated triglycine sulfate	m_f = massa final de amostra
EC ₅₀ = concentração das amostras necessária para captar 50 % do radical livre/ <i>effective concentration at 50 %</i>	m_0 = massa inicial de soluto
EM = espectrometria de massas	MAC = maceração/ <i>maceration</i>
EPA = ácido eicosapentanóico/ <i>eicosapentaenoic acid</i>	mgGAE = mg equivalente de ácido gálico/ <i>mg equivalent of gallic acid</i>
EqGA = equivalente ácido gálico	MEV = microscopia eletrônica de varredura
ESC = extração supercrítica	M_{CER} = <i>mass transfer rate in the CER period</i>
EtOH = etanol/ <i>ethanol</i>	MSE = <i>mean square error</i>

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

n = número inteiro	TPC = <i>total phenolic content</i>
N = massa de sólido inerte	UE = <i>ultrassom/ultrasound extraction</i>
OilC = extração com óleo a frio/ <i>cold oil extraction</i>	UFSC = <i>Universidade Federal de Santa Catarina</i>
OilH = extração com óleo a quente/ <i>hot oil extraction</i>	UV-Vis = <i>ultravioleta-visível/ultraviolet-visible</i>
OSA = <i>octenyl succinic anhydride</i>	UVA = <i>Universidad de Valladolid</i>
PEO-PPO-PEO = <i>poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide)</i>	v = <i>interstitial velocity of the solvent on the SFE bed</i>
PCA = precipitação com anti-solvente comprimido	X ₀ = <i>rendimento global/global yield</i>
PGSS = partículas a partir de soluções saturadas de gás	x ₀ = <i>extractable solute in the solid</i>
PUFAs = <i>polyunsaturated fatty acids</i>	X _{CER} = <i>mass ratio of extractable solute in the solid on the CER period</i>
Q _{CO₂} = vazão de CO ₂ / <i>CO₂ flow rate</i>	x _p = <i>initial mass of non-extractable material in intact cells</i>
Re = número de Reynolds/ <i>Reynolds number</i>	x _k = <i>initial mass of extractable material in intact cells</i>
RESS = rápida extensão de soluções supercríticas	Y* = <i>solubilidade do extrato na fase solvente/solubility of the extract in the solvent phase</i>
SAS = anti-solvente supercrítico/ <i>supercritical anti-solvent</i>	Y _{CER} = <i>solvent phase solute mass ratio at bed outlet in the CER period</i>
SEDS = dispersão da solução aumentada por fluidos supercríticos	YM = <i>yeast malt extract agar</i>
SEM = <i>scanning electronic microscopy</i>	ρ _a = <i>massa específica aparente/apparent solid specific mass</i>
SFEE = SAS de emulsão/ <i>supercritical fluid extraction from an emulsion</i>	ρ _s = <i>massa específica real/real solid solid specific mass</i>
Sc = número de Schmidt/ <i>Schmidt number</i>	ρ _{CO₂} = <i>massa específica do CO₂/CO₂ specific mass</i>
SFE = <i>supercritical fluid extraction</i>	ε = <i>porosidade do leito/bed porosity</i>
Sh = número de Sherwood/ <i>Sherwood number</i>	δ = <i>meia espessura das partículas (placas)</i>
SOX = Soxhlet	μ _{CO₂} = <i>viscosidade do CO₂/CO₂ viscosity</i>
SSP = <i>single plate model (Gaspar et al., 2003)</i>	%AA = <i>capacidade antioxidante/antioxidant activity</i>
TCC = <i>total carotenoid content</i>	
t = <i>time</i>	
t _{CER} = <i>time of CER</i>	
t _{FER} = <i>time of FER</i>	
t _{mi} = parâmetro ajustável do modelo de Martínez et al. (2003)	

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivo Geral.....	16
1.2 Objetivos Específicos.....	16
1.3 Estrutura do documento.....	17
1.4 Referências.....	18
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Industrialização do camarão e resíduos produzidos.....	19
2.2 Carotenóides: definição, estrutura e biossíntese.....	21
2.3 Carotenóides: propriedades e funções.....	21
2.3.1 Astaxantina.....	24
2.4 Recuperação de carotenóides de fontes naturais.....	25
2.4.1 Pré-tratamento da matéria-prima.....	26
2.4.2 Técnicas de extração de carotenóides.....	28
2.4.2.1 Extração com fluido supercrítico (ESC).....	31
2.5 Identificação e quantificação de carotenóides.....	36
2.6 Modelagem matemática da ESC.....	37
2.6.1 Modelo de Placa (SSP) proposto por Gaspar et al. (2003).....	38
2.6.2 Modelo de Sovová (1994).....	38
2.6.3 Modelo de Martínez et al. (2003).....	40
2.7 Viabilidade econômica da extração supercrítica.....	41
2.8 Precipitação e encapsulamento de compostos bioativos.....	43
2.9 Considerações sobre o Estado da Arte.....	43
2.10 Referências.....	49
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.1 Matéria-prima.....	61
3.2 Pré-tratamento da matéria-prima.....	61
3.3 Caracterização da matéria-prima.....	62
3.4 Técnicas de extração a baixa pressão do resíduo de camarão.....	63
3.4.1 Extração Soxhlet (SOX).....	63
3.4.2 Maceração (MAC).....	64
3.4.3 Ultrassom (UE).....	64
3.4.4 Extração com óleo vegetal a frio e a quente (OilC e OilH):.....	64

3.4.5 Tratamento dos extratos e eliminação dos solventes.....	65
3.5 Extração supercrítica do resíduo de camarão.....	65
3.5.1 Modelagem matemática das curvas de extração supercrítica.....	67
3.5.2 Validação do coeficiente de transferência de massa modelado através de correlações adimensionais.....	69
3.5.3 Estimativa de custos da extração supercrítica em escala industrial.....	71
3.6 Caracterização química e biológica.....	71
3.6.1 Perfil e conteúdo total de carotenóides.....	71
3.6.2 Espectro no UV-Visível.....	72
3.6.3 Espectroscopia no infravermelho.....	72
3.6.4 Capacidade antioxidante.....	73
3.6.5 Conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC).....	76
3.6.6 Composição em ácidos graxos.....	77
3.6.7 Atividades anti-obesidade e hipolipemiante.....	78
3.7 Encapsulamento de extrato de resíduo de camarão por tecnologia supercrítica.....	81
3.7.1 SAS em escala pequena.....	82
3.7.2 SAS e SFEE em escala grande.....	84
3.8 Caracterização dos produtos de encapsulamento em meio supercrítico.....	86
3.8.1 Tamanho das partículas encapsuladas.....	86
3.8.2 Distribuição do tamanho de gota da emulsão e de partícula da suspensão.....	86
3.8.3 Interação entre polímero e extrato encapsulado nas partículas produzidas.....	87
3.8.4 Eficiência de encapsulamento de astaxantina.....	87
3.8.5 Estabilidade de cor dos produtos encapsulados.....	87
3.9 Análise estatística.....	88
CAPÍTULO 4: CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO A ALTA PRESSÃO.....	93
CAPÍTULO 5: SISTEMAS A BAIXA PRESSÃO PARA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES DO RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA.....	95
5.1 Introduction.....	96
5.2 Materials and methods.....	98
5.2.1 Raw material.....	99
5.2.2 Pre-treatment methods.....	99
5.2.3 Classical method of carotenoid extraction.....	99
5.2.4 Total carotenoid content (TCC).....	99

5.2.5 Extraction techniques.....	100
5.2.6 Extract characterization.....	102
5.2.7 Statistical Analysis.....	103
5.3 Results and discussion.....	103
5.3.1 Raw material pre-treatment.....	103
5.3.2 Extraction techniques.....	105
5.4 Conclusions.....	118
5.5 References.....	119
CAPÍTULO 6: EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE CAROTENÓIDES DE RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA.....	
6.1. Introduction.....	125
6.2 Materials and methods.....	127
6.2.1 Sample preparation.....	127
6.2.2 Supercritical Fluid Extraction (SFE).....	128
6.2.3 Mathematical modeling of SFE curves.....	129
6.2.4 Validation of mass transfer coefficients by dimensionless correlations..	130
6.2.5 Extracts characterization of pink shrimp residue.....	131
6.2.6 Statistical Analysis.....	131
6.2.7 Cost estimation of industrial SFE.....	132
6.3 Results and discussion.....	132
6.3.1 Kinetics and modeling of SFE from pink shrimp residue.....	132
6.3.2 Validation of mass transfer coefficients by dimensionless correlations..	138
6.3.3 Global yield (X_0) of SFE from pink shrimp residue.....	140
6.3.4 Total carotenoid content (TCC) of SFE from pink shrimp residue.....	143
6.3.5 Carotenoid profile of SFE extracts from pink shrimp residue.....	144
6.3.6 UV-Vis Spectrum of SFE extracts from pink shrimp residue.....	148
6.3.7 Economical viability of SFE from pink shrimp residue.....	149
6.4 Conclusions.....	152
6.5 References.....	153
CAPÍTULO 7: ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DO RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA.....	
7.1 Introduction.....	161
7.2 Material and methods.....	164
7.2.1 Sample preparation.....	164
7.2.2 Extraction protocols.....	164
7.2.2.2 Supercritical Fluid Extraction.....	165

7.2.3 Antioxidant activity.....	166
7.2.3.2 β -carotene bleaching method.....	166
7.2.4 Total phenolic compounds (TPC).....	166
7.2.5 Fatty acid composition.....	167
7.2.6 Anti-obesity and hypolipidemic effects.....	167
7.2.7 Statistical Analysis.....	168
7.3 Results and discussion.....	168
7.3.1 Antioxidant activity.....	168
7.3.2 Fatty acids profile and total phenolic compounds.....	171
7.3.3 Anti-obesity and hypolipidemic effects.....	174
7.4 Conclusions.....	178
7.5 References.....	179
CAPÍTULO 8: ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DO RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA.....	185
8.1 Introduction.....	186
8.2 Material and Methods.....	189
8.2.1 Raw material preparation and extraction procedure.....	189
8.2.2 Encapsulation processes.....	190
8.2.3 Particle morphology and size.....	192
8.2.4 Interaction between polymers and encapsulated extract.....	193
8.2.5 Efficiency on astaxanthin encapsulation.....	193
8.2.6 Color stability of the encapsulated products.....	194
8.3 Results and Discussion.....	194
8.3.1 Particles morphology and size.....	194
8.3.2 Interaction between polymer and encapsulated extract.....	196
8.3.3 Efficiency on astaxanthin encapsulation.....	196
8.3.4 Color stability of the encapsulated products.....	199
8.4 Conclusions.....	200
8.5 References.....	201
CAPÍTULO 9: CONCLUSÕES.....	203
ANEXO I – PROJETO E CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO A ALTA PRESSÃO.....	207
ANEXO II – TRABALHOS PUBLICADOS/ENVIADOS.....	207

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Os processos de desenvolvimento, produção e utilização de compostos naturais com propriedades bioativas são muito importantes, especialmente devido às inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. Dentre os compostos bioativos derivados de produtos naturais estão os carotenóides, com importantes propriedades tecnológicas e biológicas.

O aproveitamento de resíduos de processamento de alimentos representa uma fonte alternativa à obtenção de insumos para a indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética e de rações para animais, permitindo a agregação de valor ao produto obtido do resíduo da agroindústria. O camarão ocupa lugar de evidência na economia pesqueira mundial, com destaque no Brasil para o litoral do estado de Santa Catarina, onde particularmente o camarão rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) apresenta produção de grande relevância. O camarão, quando industrializado, normalmente gera como resíduo o cefalotórax e o exoesqueleto, que juntos chegam a compreender 70% do peso da matéria-prima (SIMPSON e HAARD, 1985). Uma possível alternativa para a agregação de valor para este material é a sua utilização para extração de pigmentos carotenóides, devido ao potencial de aplicação destes compostos em diversas áreas.

Comparados aos corantes sintéticos, os carotenóides naturais são mais resistentes ao calor, aos processos de congelamento e apresentam eficiência, em termos de propriedades de cor, mesmo quando aplicados nos alimentos em pequenas quantidades (SKULBERG, 2004). A astaxantina, principal pigmento encontrado em crustáceos, apresenta grande potencial como corante (MEYERS e BLIGH, 1981; SIMPSON et al., 1998; GUILLOU et al., 1995), mas também oferece atividade biológica como antioxidante (SHIMIDZU et al., 1996), protetora dos efeitos da radiação UV, entre outras (HU et al., 2006).

Dentre os métodos tradicionalmente usados para a recuperação de carotenóides de fontes naturais estão as extrações com solventes orgânicos e com óleos vegetais. A extração com solvente orgânico tem como principais restrições a possível contaminação ambiental, a co-extração de compostos indesejáveis, aumentando o custo de purificação e diminuindo o rendimento dos compostos de interesse, a necessidade de remoção do solvente e, ainda, a presença no extrato de resíduos do solvente empregado. Esta última desvantagem reduz a qualidade do produto devido à toxicidade de muitos solventes utilizados nas extrações.

Assim, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas de extração alternativas com melhor seletividade e eficiência. Neste contexto, a extração com fluido supercrítico explora as propriedades dos solventes acima de seus pontos críticos, tais como alta massa específica, difusividade intermediária e baixa viscosidade. Utilizando dióxido de carbono (CO₂) como solvente, a extração supercrítica (ESC) é reconhecida como uma tecnologia limpa. O CO₂ tem como vantagens possuir uma temperatura crítica amena (304,25 K), ser atóxico, não inflamável e altamente disponível, principalmente como subproduto de outras indústrias como as que empregam fermentação (REVERCHON, 1997; FERREIRA et al., 1999).

O micro-encapsulamento é um processo físico no qual um filme fino ou camada polimérica é aplicada para envolver sólidos ou líquidos, isolando-os e protegendo-os de fatores ambientais como luz, ar e umidade. Na última década, houve um grande progresso no desenvolvimento de compostos microencapsulados, mas os dados presentes na literatura ainda são limitados para o encapsulamento efetivo de compostos corantes e antioxidantes.

Devido à estrutura molecular e à alta taxa de insaturação dos carotenóides (presença de ligações duplas em suas estruturas), fatores como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização destes compostos com perda e/ou diminuição da cor e de suas propriedades. Assim, visto que a astaxantina sofre rapidamente oxidação quando exposta ao ar, perdendo valor nutritivo, propriedades biológicas e tecnológicas, torna-se necessário o estudo de sua estabilização como, por exemplo, através de seu encapsulamento em polímeros.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar o aproveitamento do resíduo de processamento de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) na obtenção de produto com alto valor agregado, avaliando a eficiência de técnicas de extração, a qualidade dos extratos e o encapsulamento destes usando a tecnologia supercrítica.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a influência das técnicas de pré-tratamento da matéria-prima (tratamento térmico, secagem e/ou moagem) do resíduo de camarão rosa a fim de disponibilizar os compostos carotenóides para a sua extração;

- b) Avaliar o efeito do solvente e do método de extração a baixa pressão na recuperação de carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa;
- c) Projetar e construir uma unidade de extração supercrítica para operar com pressões de até 400 bar;
- d) Avaliar a cinética de extração e a modelagem matemática de curvas da ESC de extratos carotenóidicos do resíduo de processamento de camarão rosa;
- e) Avaliar as condições operacionais de ESC para a extração de carotenóides do resíduo de camarão rosa;
- f) Selecionar e avaliar a aplicação de co-solventes ao CO₂ no processo de ESC do resíduo de camarão rosa;
- g) Selecionar e avaliar a aplicação de óleos vegetais como co-solventes ao CO₂ supercrítico a fim de produzir um produto oleoso com alta concentração de carotenóides do resíduo de camarão rosa;
- h) Realizar a estimativa de custos do processo de ESC de compostos carotenóidicos do resíduo de processamento de camarão rosa;
- i) Caracterizar os extratos obtidos pelos diferentes sistemas de extração com relação ao perfil de carotenóides, os perfis espectrais nas faixas do UV-Visível e infravermelho médio;
- j) Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de resíduo de camarão através das técnicas do radical DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoléico;
- k) Avaliar o conteúdo em ácidos graxos e de compostos fenólicos dos extratos de camarão obtidos por diferentes tecnologias;
- l) Avaliar as atividades hipolipemiante e anti-obesidade *in vivo* de extratos de resíduo de camarão;
- m) Avaliar a eficiência do processo de co-precipitação/encapsulamento do extrato de resíduo de camarão em polímeros empregando dióxido de carbono como anti-solvente.

1.3 Estrutura do documento

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: o Capítulo 1, como já visto, apresenta a introdução e objetivos da presente tese de doutorado. No Capítulo 2 está apresentada a revisão bibliográfica a respeito da matéria-prima utilizada, de compostos carotenóides, de técnicas de extração e encapsulamento de compostos, modelagem matemática e estimativa de custos da extração supercrítica. O Capítulo 3 apresenta os materiais e métodos utilizados nas atividades experimentais realizadas. O Capítulo 4, juntamente com o Anexo I, oferece um relatório referente à construção do equipamento de alta pressão. Os

Capítulos 5, 6, 7 e 8 apresentam, na forma de artigos, os trabalhos produzidos nesta tese, sendo que: o Capítulo 5 refere-se ao estudo de técnicas de pré-tratamento da matéria-prima e das técnicas a baixa pressão de extração de carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa; o Capítulo 6 descreve o estudo da tecnologia supercrítica aplicada à extração de carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa; no Capítulo 7 é mostrada a avaliação das atividades antioxidante, anti-obesidade e hipolipemiante dos extratos do resíduo de processamento de camarão rosa obtidos pelas diferentes técnicas de extração; e o Capítulo 8 considera o estudo de co-precipitação do extrato de camarão rosa em polímero utilizando dióxido de carbono como anti-solvente. Por fim, o Capítulo 9 apresenta as conclusões gerais e, ao final deste documento estão apresentadas as publicações já realizadas (Anexo II), de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

1.4 Referências

- FERREIRA, S. R. S.; NIKOLOV, Z. L.; DORAISWAMY, L. K.; MEIRELES, M. A. A.; PETENATE, A. J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 14, p. 235-245, 1999.
- GUILLOU, A.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. **Aquaculture**. v.130, p. 351 - 360, 1995.
- HU, Z-C; ZHENG, Y-O; WANG, Z.; SHEN, Y-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 586-590, 2006.
- MEYERS, S. P.; BLIGH, D. Characterization of Astaxanthin Pigments from Heat-Processed Crawfish Waste. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 29, n. 3, p. 505 - 508, 1981.
- REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 10, p. 1-37, 1997.
- SHIMIDZU, N., GOTO, M., MIKI, W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. **Fisheries Science**. v. 62, n. 1, p. 134-137, 1996.
- SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V. ASHIE, I. N. A. Enzymatic Hidrolysis of Shrimp meat. **Food Chemistry**, v. 6, n. 1/2, p. 131 -138, 1998.
- SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 7, p. 212–222, 1985.
- SKULBERG, O. M. Bioactive chemicals in microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.) **Handbook of Microalgae Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, p. 485-512, 2004.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Industrialização do camarão e resíduos produzidos

A pesca de captura marinha teve uma produção de 79,9 milhões de toneladas em 2009 (FAO, 2010). No Brasil, a região Sul é a maior produtora de pescado por meio da pesca extrativa marinha, com valor total estimado de R\$ 238.088.825,00 em 2007. No ano de 2006 o estado de Santa Catarina foi o maior produtor da pesca extrativa marinha, com produção de 127.164 t. Neste estado a produção de crustáceos apresentou um crescimento de 39 %, principalmente devido à produção do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*), alcançando 498 t (um aumento de 102,5 %), seguido da produção de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) com 305 t (IBAMA, 2008).

O camarão marinho ocupa lugar de destaque no contexto da economia pesqueira mundial, quer pelo grande volume de captura e ampla distribuição geográfica, ou pelo seu alto valor nutritivo (ABCC, 2000).

Quando o camarão não é comercializado *in natura* sua industrialização para obtenção de produtos sem cabeça gera como resíduo o cefalotórax, enquanto os produtos descascados têm como resíduo o cefalotórax e exoesqueleto. O cefalotórax compreende entre 30 % a 40 % da matéria-prima e o exoesqueleto em torno de 37 %; juntos chegam a representar cerca de 70 % do peso da matéria-prima (SIMPSON e HAARD, 1985; CTTMAR-UNIVALI, 2000). Esses resíduos constituídos basicamente de cefalotórax, exoesqueleto, vísceras e restos musculares contribuem para o aumento da poluição ambiental quando descartados indevidamente (FAMINO et al., 2000; SHAHIDI e SYNOWIECKI, 1991).

A cabeça de camarão, com baixíssimo valor comercial, é uma fonte de poluição ambiental, além de gerar custos adicionais durante seu descarte, reduzindo a margem de lucro do sistema de produção. De 2004 a 2007, o Brasil produziu aproximadamente 50.000 t de camarão descabeçado. No caso específico do *L. vannamei*, o cefalotórax constitui aproximadamente 33% da massa corpórea, dependendo do tamanho dos animais (NUNES, 2001), os quais geralmente continuam sendo descartados pelas unidades beneficiadoras, sem qualquer tipo de aproveitamento tecnológico (OGAWA et al., 2007).

Os resíduos são definidos como subprodutos e/ou sobras do processamento de alimentos de valor econômico relativamente baixo. O aproveitamento dos resíduos industriais representa fonte potencial para obtenção de ingredientes para o processamento de ração animal e de

alimentos. A necessidade de implantar sistemas de aproveitamento de resíduos industriais é embasada em fatores econômicos e ambientais através da otimização dos processos e também do desenvolvimento de novos produtos a partir dos resíduos líquidos ou sólidos provenientes das etapas de processamento (ORNUM, 1992).

O resíduo do camarão é basicamente constituído de proteína, quitina, minerais, e carotenóides, essencialmente a astaxantina, cujos percentuais variam conforme a espécie, as partes constituintes, o local da pesca, do tratamento térmico ou do método de desidratação usado (MANDEVILLE et al., 1992), além da variação sazonal das espécies (BATAILLE e BATAILLE, 1983; SAHIDI e SYNOWIECKI 1991; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2000).

Muitos estudos foram realizados quanto ao aproveitamento destes resíduos, sob diversas formas, a saber: farinha de camarão (NUNES et al., 1978); elaboração de produtos flavorizantes, quitina e quitosana (HOLANDA, 2004). Uma possível alternativa de grande agregação de valor para este material é a sua utilização para extração de pigmentos carotenóides, por existir potencial e demanda pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e de ração (OGAWA et al., 2007).

O aproveitamento do resíduo do camarão, assim como dos resíduos de outros crustáceos deve-se principalmente ao seu elevado conteúdo de quitina. Porém, existe também interesse na recuperação de outros componentes do resíduo de camarão como proteína, carotenóides e componentes flavorizantes (MEYERS, 1986). Uma vez recuperada, a astaxantina, o principal carotenóide presente em crustáceos, pode ser incorporada em rações destinadas a salmonídeos e crustáceos para promover a pigmentação característica destas espécies (CHEN e MEYERS, 1982; MEYERS, 1986; GUILLOU et al., 1995).

Pesquisas relacionadas aos lipídios de camarão têm tratado, principalmente, do conteúdo de colesterol e do perfil do total de ácidos graxos. As pesquisas indicam que as espécies deste crustáceo geralmente apresentam perfil de ácidos graxos semelhantes, com pequenas variações no conteúdo de colesterol. A variação sazonal na concentração destes compostos tem sido atribuída a fatores como temperatura da água, nutrição e estágio de desenvolvimento (BRAGAGNOLO e RODRIGUES-AMAYA, 2001). Embora o camarão seja uma rica fonte de proteína, é um alimento com alto teor de colesterol (127 ± 9 mg/100 g para camarão rosa – BRAGAGNOLO e RODRIQUEZ-AMAYA, 1997), e isto é preocupante porque doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no Brasil e em muitos outros países. Por outro lado, alimentos marinhos, incluindo o

camarão (BOTTINO et al., 1979), são ricos em ácidos graxos poli-insaturados que são considerados anti-hipercolesterolêmicos. Os ácidos graxos poli-insaturados de origem marinha são provenientes de plantas marinhas, como fito plâncton e algas, que fazem parte da cadeia alimentar e são incorporadas aos lipídios dos animais marinhos (DYEBERG, 1986).

2.2 Carotenóides: definição, estrutura e biossíntese

Carotenóides são pigmentos lipossolúveis amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados em fungos, em bactérias e em todos os tecidos de plantas verdes e também em animais (SIMPSON e CHICHESTER, 1981). Apresentam ampla utilidade para o homem devido ao seu poder corante, que pode variar do amarelo ao vermelho. São corantes naturais de frutas, legumes e de algumas espécies de peixes e crustáceos.

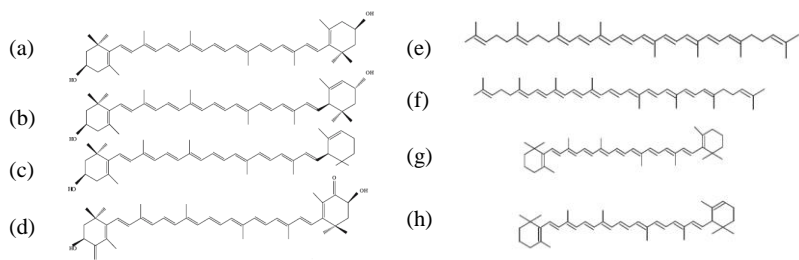
Os carotenóides são isoprenóides sintetizados por todos os microrganismos fotossintéticos (incluindo plantas, algas e ciano bactérias) e também por algumas bactérias não-fotossintéticas e fungos. (BOTELLA-PAVÍA e RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006).

A maioria dos carotenóides são tetraterpenos (C_{40}) constituídos por 8 unidades isoprenóides ligadas de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. A estrutura básica acíclica C_{40} pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização, ou oxidação. A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados (OLIVIER e PALOU, 2000). A Figura 2.1 apresenta a estrutura de alguns carotenóides.

2.3 Carotenóides: propriedades e funções

Os carotenóides são corantes naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha, muito empregados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e de ração animal. Existem aproximadamente 600 carotenóides encontrados na natureza, os quais são divididos em dois grandes grupos: (1) carotenos, que consistem em hidrocarbonetos puros, e (2) xantofilas, que são hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados (HAEGELE et al., 2000). Desses dois grupos, cerca de 70 podem ser encontrados nos alimentos,

dentre os quais o β -caroteno, o α -caroteno, a luteína, a zeaxantina, o licopeno e a astaxantina (GOMES, 2007).



Fonte: SILVA, 2004

Figura 2.1 Estrutura química dos principais carotenóides: Xantofilas - (a) zeaxantina, (b) luteína, (c) criptoxantina e (d) astaxantina; Carotenos - (e) neurosporeno, (f) licopeno, (g) β -caroteno e (h) α -caroteno, respectivamente.

Nas indústrias de alimentos, os carotenóides são utilizados principalmente como corantes com o objetivo de repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, além de dar cor aos alimentos incolores e de uniformizar a coloração de alguns produtos alimentícios. Neste sentido, são amplamente utilizados para conferir ou intensificar a cor em sucos de frutas, pastas alimentícias, bebidas, doces, margarinas, queijos, salsichas e outros. Ainda, indiretamente, através da dieta, servem para intensificar a cor de alimentos, como por exemplo, da gema do ovo, da pele do frango, da musculatura de salmónídeos e do exoesqueleto de crustáceos (OMARA-ALWALA et al., 1985; GUILLOU et al., 1995; WATHENE et al., 1998; AKSU e EREN, 2007).

Por fim, podem também ser usados para colorir cápsulas de medicamentos e cosméticos (KLAUI e BAUERNFEIND, 1981; NIIZU, 2003). Os carotenóides são também precursores de muitos compostos químicos importantes, responsáveis pelo aroma de alguns alimentos, fragrâncias de algumas flores (SÁNCHEZ-CONTRERAS et al., 2000), coloração específica e foto proteção (MARASCO e SCHMIDT-DANNERT, 2003).

Em formulações comerciais, os carotenóides utilizados podem ser de dois tipos: extratos naturais e corantes sintéticos idênticos aos naturais. A grande demanda gerada pelas indústrias e a crescente procura por produtos naturais têm resultado em um aumento nas pesquisas referentes à produção e extração de carotenóides. Além da conotação “natural”, os

produtos obtidos por extração e mesmo através de produção microbiana podem ser obtidos em curto prazo, em qualquer época do ano (TATSCH, 2008).

Além de colorir, os carotenóides possuem atividades biológicas importantes destacando-se a prevenção de doenças inflamatórias e neurodegenerativas onde as espécies reativas apresentam papel fundamental, e.g., arteriosclerose, catarata, esclerose múltipla, câncer, mal de Alzheimer, degeneração macular e doenças cardiovasculares (MOELLER et al., 2000; NIIZU, 2003; BHOSALE, 2004; MALDONADE et al., 2007; AKSU e EREN, 2007). Assim, mais recentemente, os carotenóides também têm sido adicionados aos alimentos devido as suas atividades biológicas, a fim de enriquecer o produto alimentício.

Estudos associaram uma baixa ingestão de frutas e vegetais com alto teor de carotenóides com o aumento do risco de câncer (BLOCK et al., 1992; SOUTHON, 2000; ZIEGLER, 1989). A combinação de resultados de estudos epidemiológicos com ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstrou a proteção dos carotenóides em relação a câncer de próstata, de esôfago, de pulmão e de mama (ASTORG, 1997; RAO e AGARWAL, 1999; ROCK, 1997). Os carotenóides têm demonstrado importantes efeitos na prevenção de câncer e na redução do risco de ataques cardíacos (SHEKELLE et al., 1981; KARDINAAL et al., 1993, SUM e TEMELLI, 2006).

O mecanismo mais citado pelo qual o carotenóide confere esta proteção é o da ação antioxidante (EDGE et al., 1997; PAIVA e RUSSEL, 1999). A capacidade antioxidante dos carotenóides deve-se ao longo sistema de ligações duplas conjugadas (MATOS et al., 2000; YOUNGE e LOWE, 2001), as quais “sequestram” os radicais livres e, assim, interrompem a pato fisiologia de várias doenças crônicas (SUM e TEMELLI, 2006). Outros possíveis mecanismos são a modulação do metabolismo de carcinógenos, a inibição da proliferação celular, o aumento da diferenciação de células através dos retinóides, a estimulação da comunicação intercelular e o aumento da resposta imunológica (OLSON, 1999; TROSKO, 2001).

Devido à alta taxa de insaturação, fatores tais como o calor, a luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, à forma *cis*, promovendo ligeira perda de cor e da atividade pró-vitamínica. Os carotenóides são também susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas,

metais, pró-oxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz (JOHNSON e SCHROEDER, 1995).

2.3.1 Astaxantina

A astaxantina é um pigmento encontrado em animais aquáticos, tais como lagosta, siri e camarão. Este pigmento apresenta importante atividade biológica, principalmente protegendo sistemas contra espécies reativas, peroxidação lipídica oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados essenciais, luz UV-b, entre outros (HU et al., 2006).

Astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-diona) é um oxicarotenóide de fórmula $C_{40}H_{52}O_4$ e peso molecular 596,86 g/mol. Na forma cristalina e pura, aparece como um pó fino de coloração escura violeta amarronzada. Seu ponto de fusão é de aproximadamente 497.15 K. É insolúvel em solução aquosa, podendo ser dissolvida à temperatura ambiente em diclorometano, clorofórmio, acetona, dimetilsulfóxido e outros solventes não polares. Seu espectro de absorção representa um polieno conjugado, com $\lambda_{\text{máx}}$ de 489 nm em clorofórmio, 478 nm em etanol e 480 nm em acetona (JOHNSON e AN, 1991).

Um crescente interesse no uso de astaxantina na avicultura e na piscicultura tem se desenvolvido (OMARA-ALWALA et al., 1985; GUILLOU et al., 1995; WATHENE et al., 1998; PANGANTIHON-KUHLMANN et al., 1998) uma vez que este pigmento não é sintetizado por animais, devendo ser adicionado às rações de forma a se obter uma coloração atraente para os consumidores. Assim, a astaxantina de origem natural tem sido avaliada como uma fonte pigmentante em alguns estudos, administrada às dietas de diferentes espécies de camarões - *Penaeus japonicus* (CHOUBERT e LUQUEST, 1983), copépodos, *C. Finmarchicus*, krill, *Euphasia sp.* (LAMBERSTEN e BREKKAN, 1971) - a fim de que estes desenvolvam maior pigmentação de seus tecidos, agregando valor às biomassas de uso comercial. Aliado a isso, estudos investigam também a presença de astaxantina em exoesqueleto de camarão, lagosta, caranguejo e outros crustáceos (GUILLOU et al., 1995; SIMPSON et al., 1998; CHEN e MEYERS, 1982; MEYERS e BLIGH, 1981). Wathene et al. (1998) observaram aumento de intensidade da coloração em salmão utilizando dieta contendo astaxantina. Pangantihon-Kuhlman et al. (1998), avaliando dieta para camarão suplementada com astaxantina, observaram resultados semelhantes.

Além disso, a astaxantina é um poderoso antioxidante, com atividade 10 vezes superior à zeaxantina, luteína, cantaxantina e β -caroteno

(SHIMIDZU et al., 1996). Ainda, apresenta propriedades antitumorais, o que aumenta seu potencial de utilização na área da saúde (OGAWA et al., 2007).

Atualmente, toda a produção comercial de astaxantina é de forma sintética através de fontes químicas, com uma movimentação anual de US\$ 200 milhões, gerando um preço de mercado de US\$ 2.000,00/kg_{astaxantina} (ALGA TECHNOLOGIES, 2009). Estes altos custos de síntese, aliado à crescente preocupação com a segurança alimentar ocasionada pelos aspectos negativos dos pigmentos sintéticos, tem estimulado a busca de alternativas naturais para estes corantes.

A coloração avermelhada contribui significativamente para a imagem da carne dos salmonídeos, e pode ter um grande valor, se analisado como indicador de qualidade do produto (SYLVIA et al., 1995). Esta característica é distintiva desse grupo, o que contribui a dar um selo de exclusividade a sua imagem, diferentes de outros produtos alimentícios de origem animal que são julgados basicamente pelo seu sabor, textura, entre outros fatores (PASSOS, 2001).

A determinação da concentração de astaxantina nos crustáceos varia em função do método de extração empregado e também da espécie utilizada como matéria-prima. Óleos vegetais, como o de soja, e solventes orgânicos são utilizados para sua extração, sendo o óleo mais comumente usado por ser considerado uma boa barreira contra oxigênio, retardando a subsequente oxidação, além de ser utilizado como fonte de energia (MEYERS e BLIGH, 1981; CHEN e MEYERS, 1982; CHEN et al., 1998; NEGRO e GARRIDO-FERNÁNDEZ, 2000).

2.4 Recuperação de carotenóides de fontes naturais

A bioprodução industrial de carotenóides está bem estabelecida e vem se expandindo comercialmente. Porém, as operações de extração e recuperação do produto, bem como a extração diretamente a partir de matrizes vegetais consideradas fontes desses compostos estão ainda em fase de desenvolvimento. Além disso, esta etapa do processo contribui para aumento dos custos da produção, enfatizando a necessidade de aprofundamento dos estudos nesta área.

No passado, carotenóides eram extraídos especialmente com solventes orgânicos. Entretanto, com o aumento das restrições ao uso de solventes por vezes tóxicos, o interesse dos consumidores pelo uso de produtos naturais e o recente desenvolvimento da tecnologia supercrítica, promoveu um crescente empenho na recuperação de substâncias biologicamente ativas de fontes naturais utilizando o CO₂ supercrítico (SUM e TEMELLI, 2006).

2.4.1 Pré-tratamento da matéria-prima

Os carotenóides são amplamente encontrados em diversas fontes naturais (alimentos), entretanto com biodisponibilidades distintas, que são afetadas principalmente por: (1) características do próprio alimento e da sua matriz; (2) binômio tempo/temperatura de processamento; (3) tipo de calor empregado no processamento; (4) presença e/ou utilização de potencializadores absorvíveis dos carotenóides, tais como os ácidos graxos presentes em óleos vegetais (GOMES, 2007).

Kaiser et al. (2007), a fim de facilitar a extração de carotenóides produzidos por *Micrococcus luteus* e *Rhodotorula glutinis* com a mínima degradação possível, avaliaram um método em escala pequena usando hidrólise enzimática da biomassa. A metodologia avaliada utilizou duas enzimas (*lysozyme* e lipase ou *lyticase* e lipase), seguido de tratamento mecânico da biomassa com ciclos de sonicação e congelamento e tratamento químico com dimetilsulfóxido. Para a extração os autores empregaram uma mistura de metanol e clorofórmio estabilizados com hidroxitoluenobutilado (BTH) e α -tocoferol. Para a avaliação da recuperação e reprodutibilidade do método de extração foi utilizado padrão interno de carotenos. O método avaliado se mostrou uma ferramenta sensível na determinação de carotenóides oriundos de microrganismos.

Perdigão et al. (1995) estudaram a extração de pigmentos de carapaças de lagosta, camarão e caranguejo. As matérias-primas empregadas, com e sem tratamento térmico prévia por imersão em água fervente, foram secas em estufa com circulação de ar a 333,15 K, durante 5 horas, e trituradas, sendo a granulometria de 2 mm selecionada para as extrações. Na sequência, as amostras foram adicionadas de óleo de soja refinado comercial numa proporção de 1:1 (m/v) em banho-maria a 353,15 K, durante 30 min. O óleo enriquecido de carotenóides foi separado da farinha por centrifugação e os teores de carotenóides determinados. As amostras pré-tratadas com tratamento térmico apresentaram maior teor de pigmentos, o que significa que este pré-tratamento pode provocar uma quebra de ligação do complexo caroteno-proteína, facilitando assim a extração. Neste mesmo estudo, constatou-se que a lagosta vermelha (7,73 mg/100 g) apresentou uma maior concentração de astaxantina em relação à lagosta verde (5,50 mg/100 g); os camarões rosa e branco apresentaram teor de carotenóides de 12,66 e 9,93 mg de astaxantina por 100 g de óleo pigmentado, respectivamente; enquanto o caranguejo aratu se mostrou

com considerável teor de astaxantina (17,7 mg/100 g), seguido do caranguejo-uçá (3,15 mg/100 g) e do guaiamum (2,11 mg/100 g).

Gu et al. (2008) compararam três pré-tratamentos (ultrassom, moagem e adição de 3 mol/L de HCl 3 mol/L), o efeito da temperatura (283,15 a 343,15 K), da razão soluto: solvente (10 a 130, v/m) e do tempo (10 a 130 min) no rendimento de extração de carotenóides de *R. sphaeroides*. Como resultado, a adição de HCl foi o método mais efetivo para a extração dos carotenóides. Na etapa de otimização, os melhores resultados de extração de carotenóides de *R. sphaeroides* foram encontrados quando se utilizou a temperatura de 303,15 K, razão ótima de soluto/solvente de 40 e a extração máxima dos carotenóides foi obtida no tempo de 40 min.

Fox (1973 apud GUILLOU et al., 1995) somente alcançou extração total dos pigmentos carotenóides da casca de caranguejo com acetona ou metanol, após descalcificação da casca com ácido acético. Omara-Alwala et al. (1985) reportaram que o uso do ácido propiônico aumentou em 35 % a recuperação da astaxantina do resíduo de lagostim. Guillou et al. (1995) obtiveram uma extração 15 % maior de astaxantina no resíduo de camarão *Pandalus borealis* submetido à silagem ácida, quando comparado à extração do resíduo *in natura*.

A hidrólise enzimática tem sido considerada um método viável como pré-tratamento para a recuperação da astaxantina (CHEN et al., 1985; GILDBERG e STENBERG, 2001). Holanda (2004) realizando extração com solvente deste carotenóide a partir de resíduo de camarão obteve uma extração duas vezes mais eficiente que a realizada com óleo, tanto no resíduo sem pré-tratamento como em frações solúvel e insolúvel obtidas após hidrólise enzimática. Na extração com solvente a recuperação foi de 17 % a 31 % superior após a hidrólise enzimática. A maior recuperação foi de 12,01 mg astaxantina por 100 g de resíduo seco, quando utilizada hidrólise com alcalase, e a maior parte da astaxantina (70 %) foi proveniente da fração insolúvel obtida após hidrólise enzimática.

Chen e Meyers (1982) observaram um leve aumento (de 3 % a 5 %) na extração da astaxantina com o aumento do tempo de hidrólise do resíduo de camarão *Solenocera melanthera* obtida empregando diversas proteases comerciais. Segundo os autores, o aumento da extração observado com o aumento da extensão da hidrólise e tendo em vista a enzima utilizada deve-se, provavelmente, à habilidade diferencial destas na quebra da ligação proteína-carotenóide, permitindo a recuperação do pigmento no óleo ou no solvente orgânico.

Em função da forte associação dos carotenóides com as células dos microrganismos produtores e, no sentido de maximizar a extração dos pigmentos, Valduga (2005) testou 11 métodos diferentes de rompimento celular e de extração com solventes. Foi constatado que quando utilizada a combinação nitrogênio líquido e dimetilsulfóxido para a ruptura celular, seguida da extração com mistura de acetona e metanol (7:3, v/v), obteve-se a maior recuperação de carotenóides da levedura *S. salmonicolor* cultivada em meio ágar YM (*Yeast Malt Extract Agar*).

2.4.2 Técnicas de extração de carotenóides

Para a extração e recuperação de carotenóides, seja a partir de biomassa de microrganismos produtores ou diretamente a partir de matrizes vegetais que contêm estas substâncias, podem ser utilizados como solventes óleos vegetais, solventes orgânicos ou fluidos supercríticos.

Alguns solventes orgânicos são permitidos para uso nas indústrias de alimentos, como acetona, álcool benzílico, acetato de etila, hexano, isopropanol, metanol, metil-etil-cetona e etanol, sendo que o uso e suas concentrações dependem do tipo de alimento onde os mesmos serão empregados (FOOD AND DRUG REGULATION, 2005). Carotenóides foram extraídos com sucesso a partir de ovas de peixe usando acetona como solvente (LI et al., 2005) e de resíduo de camarão *Penaeus indicus* com isopropanol, acetona e hexano (SACHINDRA et al., 2006). Ainda, Sachindra et al. (2006) relataram que o uso de uma mistura de solventes polares e não-polares produz altos rendimentos (49,9 µg/g de resíduo utilizando hexano:isopropanol, 50:50) na extração de carotenóides de resíduo de camarão *Penaeus indicus* devido ao fato de que as xantofilas são extraídas com sucesso por solventes polares, enquanto que os carotenos são melhor extraídos da matriz por solventes apolares. Segundo Britton (1985) o uso de um solvente polar miscível em água, como acetona, metanol ou etanol, se mostra efetivo na extração de carotenóides de tecidos contendo água. Por outro lado, o uso de solventes apolares não é recomendado em tecidos com alto teor de água porque a penetração desses na parte hidrofóbica que circunda os pigmentos é limitada (DELGADO-VARGUS et al., 2000).

A extração com solventes orgânicos se firma no emprego de altas temperaturas de operação e das interações entre os solventes e os componentes presentes na matéria-prima, em função da afinidade química existente entre eles (MARKOM et al., 2007). Carotenóides são compostos de baixa polaridade e, portanto, solúveis em solventes de baixa polaridade como o hexano. Entretanto, essas moléculas orgânicas

possuem uma parte polar solúvel em solventes polares e uma parte apolar, aumentando o espectro de solventes orgânicos com utilidade na extração destes.

Quando um solvente orgânico é utilizado em sua temperatura de ebulição, a tensão superficial e viscosidade do solvente são muito reduzidas quando comparadas a uma temperatura inferior. Assim, o solvente pode alcançar com maior facilidade os espaços da matriz que contêm solutos, solubilizando uma maior quantidade e variedade de compostos (MARKOM et al., 2007).

A recuperação do solvente é a etapa crucial no processo de extração com solventes orgânicos devido principalmente aos fatores de segurança operacional, ambientais e econômicos. Por outro lado, a extração com solventes orgânicos apresenta como principais desvantagens a possível degradação térmica do extrato, a eliminação incompleta do solvente, é um processo lento e a baixa seletividade do processo (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

A extração com solvente orgânico é efetiva na extração de carotenóides totais (KOPAS e WARTHESEN, 1995; DE SIO et al., 2001). Entretanto, conforme já relatado, as temperaturas altas requeridas para a remoção dos solventes podem resultar em degradação desses pigmentos, além da possibilidade do produto final conter quantidades residuais de solvente e, conseqüentemente, reduzir seu potencial para utilização em produtos alimentícios (BABU et al., 2008).

O óleo vegetal vem sendo utilizado como solvente para a extração de carotenóides. A vantagem de se utilizar óleos vegetais é que estes são considerados protetores eficientes da ação do oxigênio, retardando os processos de oxidação, além de sua utilização como fonte lipídica na posterior aplicação em alimentos (MEYERS e BLIGH, 1981; CHEN e MEYERS, 1982; SHAHIDI e SYNOWIECKI, 1991; CHEN et al., 1998; NEGRO e GARRIDO-FERNÁNDEZ, 2000). A eliminação do solvente não é empregada quando se utiliza óleo vegetal, sendo o produto obtido uma mistura óleo/extrato rico em carotenóides e o processo não apresenta os inconvenientes de degradação térmica dos extratos.

A fim de aperfeiçoar a extração de carotenóides de resíduo de *crayfish* Chen e Meyers (1982) utilizaram solvente orgânico e alcançaram 16,15 mg de astaxantina por 100 g de resíduo, contra 8,0 mg de astaxantina por 100 g, com extração com óleo de soja. Meyers e Bligh (1981), por sua vez, na extração com solvente em resíduos de *crayfish* obtiveram concentração de 15,3 mg de astaxantina por 100 g de resíduo. Essas diferenças devem-se geralmente ao teor de carotenóides

disponível na alimentação, às condições ambientais, à espécie animal (SHAHIDI e SYNOWIECKI, 1991) e ao método utilizado para extração e quantificação da astaxantina. Variáveis como a granulometria do resíduo, a temperatura e a relação resíduo/solvente podem levar a diferenças no rendimento de extração.

Shahidi e Synowiecki (1991), Saito e Regier (1971) utilizaram resíduo de camarão (*Pandalus borealis*) e casca de caranguejo (*Chionoectes opilio*) para extração de astaxantina e quitina. Na extração de carotenóides os autores utilizaram óleo de fígado de bacalhau (2 partes de óleo para 1 parte de resíduo, v/m) na temperatura de 333,15 K, durante 30 min. Em seguida a mistura foi filtrada e seca a vácuo na temperatura de 333,15 K, separando a água do extrato de carotenóides e água. Como resultados obtiveram 74 % da extração de astaxantina do resíduo de camarão (14,77 mg/100 g de resíduo seco) e 56 % da casca de caranguejo (11,9 mg/100 g de resíduo seco).

Sachindra e Mahendrakar (2005) utilizaram óleos vegetais (girassol, gengibre, mostarda, soja, côco e arroz) para a extração de carotenóides de resíduo de camarão *Peaneus indicus* e, posteriormente, otimizaram o processo avaliando os efeitos da temperatura (313,15, 343,15 e 373,15 K), do tempo de extração (60, 120 e 150 min) e da razão entre volume de óleo e massa de resíduo (0,5; 2 e 3,5). O melhor rendimento de carotenóides ($26,3 \pm 2,31 \mu\text{g/g}_{\text{resíduo}}$) foi obtido utilizando o óleo de girassol a 343,15 K/150 min e razão óleo/resíduo de 2:1 (v/m).

O ultrassom é um processo que utiliza a energia das ondas ultrassônicas que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva humana, ou seja, acima de 20,0 kHz. As ondas de ultrassom se propagam na matéria, criando no meio que se propagam ciclos de expansão e compressão no meio. Em um líquido, estas ondas criam um ciclo de expansão, o que produz uma pressão negativa, podendo gerar bolhas ou cavitação (LUQUE-GARCÍA e DE CASTRO, 2003). O uso do ultrassom é promissor por não utilizar aquecimento e não gerar danos aos compostos termos sensíveis. Além destas vantagens, o procedimento é rápido e fácil de ser realizado, não sendo necessários equipamentos especiais (ALISSANDRAKIS et al., 2003).

Os principais efeitos do ultrassom na extração são o aumento da permeabilidade das paredes celulares, a produção de cavitações, ou seja, formação de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultando em um forte estresse dinâmico e, conseqüentemente, o aumento do estresse mecânico das células, também chamado de fricção interfacial (JACQUES, 2005). Desta forma, esta técnica pode facilitar a dilatação e a hidratação do material, aumentando o tamanho dos poros

da parede celular e otimizando os processos de difusão e de transferência de massa. Um aumento no tecido celular ao dobro do seu volume pode, em alguns casos, quebrar a parede celular, o que causa a saída de compostos celulares, além de aumentar a eficiência da extração e/ou redução do tempo de extração (VINATORU, 2001; JACQUES, 2005). Assim, a extração com ultrassom é utilizada em diversas áreas, tais como na extração de vitaminas A, D e E de plantas (LUQUE-GARCÍA e DE CASTRO, 2003).

Macías-Sanchez et al. (2009) estudaram a extração de carotenóides e clorofila a partir da microalga *Dunaliella salina* utilizando as técnicas de ultrassom-assistido, com N,N'-dimetilformamida e metanol, e extração supercrítica com dióxido de carbono. Os resultados obtidos indicaram superioridade do método de ultrassom utilizando metanol em relação ao rendimento de extração, mas maiores seletividades para extração de carotenóides quando usado a tecnologia supercrítica.

Sun et al. (2006) estudaram a eficiência da extração com solvente orgânico, da saponificação seguida de extração com solvente orgânico e do método de ultrassom-assistido com solvente orgânico na extração de luteína de fígado de frango, a fim de quantificar esse carotenóide por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). De acordo com os resultados obtidos pelos autores, todos os métodos produziram quantidades de luteína estatisticamente diferentes, com superioridade do método ultrassônico (10,4 µg/g).

2.4.2.1 Extração com fluido supercrítico (ESC)

A tecnologia supercrítica utilizando dióxido de carbono (CO₂) próximo ao ponto crítico como solvente na extração de compostos como carotenóides tem sido considerada uma alternativa pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (MEIRELES, 2003). O emprego industrial da ESC vem ganhando espaço, principalmente devido aos fatores ambientais e de qualidade envolvidos. Trata-se de um processo livre de resíduos tóxicos, não necessita de pós-processamento dos extratos para a eliminação do solvente e não provoca a degradação térmica dos extratos por permitir o emprego de baixas temperaturas, e previne reações de oxidação, pela ausência de luz e oxigênio. Além disso, é um processo flexível devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solvatação e seletividade do solvente (BRUNNER, 1994; MARTÍNEZ et al., 2004; ROSA e MEIRELES, 2005; MICHIELIN et al., 2005; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

O CO₂ supercrítico é essencialmente um solvente apolar e seu poder de solvatação varia com a massa específica. Este solvente permite

extrair grande variedade de compostos lipofílicos, como os carotenóides, dependendo da pressão aplicada (ARAÚJO, 1999). A solubilidade do soluto no fluido supercrítico aumenta com a pressão de operação a uma temperatura constante, devido ao aumento da massa específica do solvente, porém a seletividade do processo é diminuída (REVERCHON e DE MARCO, 2006).

O processo de extração supercrítica pode ser uma alternativa aos métodos convencionais de extração de carotenóides (BABU et al., 2008), podendo ser utilizado com o solvente supercrítico puro, normalmente CO₂ ou com adição de co-solvente.

França et al. (1999) realizaram a extração da polpa de buriti (*Mauritia flexuosa*) com CO₂ supercrítico a fim de obter frações de óleo com alta concentração de β-caroteno. Como resultados obtiveram que o CO₂ supercrítico na pressão de 200 bar e temperatura de 313,15 K extraiu aproximadamente 80 % do conteúdo de β-caroteno comparado ao extrato hexânico.

Mendes et al. (1995) realizaram a ESC de lipídeos e carotenóides da microalga *Chlorella vulgaris* nas temperaturas de 313,15 e 328,15 K e pressões de 150 a 350 bar. Tanto o teor de lipídeos como o de carotenóides aumentou com o aumento da pressão de ESC, sendo que o último se apresentou maior quando comparativamente à extração convencional com hexano e acetona. Posteriormente, os mesmos autores (MENDES et al., 2003) ampliaram a pesquisa para 3 espécies de microalgas (*Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella salina*), objetivando maximizar a extração de carotenóides e outros lipídeos por ESC com CO₂. Os experimentos de ESC foram conduzidos nas temperaturas de 313,15 e 333,15 K e pressões de 100 a 350 bar. Como resultados, os autores relataram que a 313,15 K e 200 bar a microalga *Botryococcus braunii* produziu um extrato supercrítico dourado e límpido, distinto do obtido via extração convencional. Para a microalga *Chlorella vulgaris*, a ESC produziu extratos com cantaxantina e astaxantina, sendo que o rendimento de carotenóides aumentou com o incremento da pressão e apresentou uma faixa de inversão das isotermas de 275 a 350 bar. Já, para a alga *Dunaliella salina*, os resultados indicaram que o isômero *cis* deste carotenóide é mais solúvel no CO₂ supercrítico a 300 bar e 313,15 K.

Macías-Sánchez et al. (2007) extraíram com CO₂ supercrítico amostras de biomassa seca da ciano bactéria *Synechococcus sp.*, a fim de concentrar carotenóides e clorofila, nas condições de 100 a 500 bar de pressão e 313,15 a 333,15 K. A maior concentração de carotenóides totais foi obtida a 300 bar e 323,15 K (1,5 µg/mg de microalga seca),

enquanto que a maior relação carotenóides/clorofila foi obtida a 200 bar e 313,15 K (193 µg de carotenóides por µg de clorofila). Nesta condição foi obtida a maior seletividade, facilitando a separação e purificação destes dois grupos de pigmentos. Segundo os autores, o CO₂ supercrítico é um solvente adequado para extração de carotenóides devido à baixa polaridade destes componentes, tornando o processo seletivo para os carotenóides em detrimento de outros mais polares como a clorofila.

Machmudah et al. (2008) realizaram a extração supercrítica do fruto da rosa (*Rosa canina*) em condições de 150 a 450 bar, 313,15 a 353,15 K e vazão de CO₂ de 2 a 4 mL/min, buscando otimizar a extração de carotenóides. As concentrações totais destes pigmentos foram de 10,35 a 20,88 mg/g de fruto, sendo a máxima concentração obtida a 353,15 K, 450 bar e 4 mL/min. Os principais carotenóides presentes no extrato foram o licopeno (1,18 a 14,37 mg/g), o β-caroteno (0,15 a 1,02 mg/g) e a luteína (1,26 a 16,84 mg/g). Os resultados demonstraram efeitos significativos da temperatura no rendimento de carotenóides totais, da temperatura, pressão e vazão de CO₂ no rendimento de licopeno e da pressão e vazão de CO₂ no rendimento de β-caroteno e luteína.

Filho et al. (2008) realizaram extração de carotenóides com CO₂ supercrítico de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Foram avaliadas duas condições de temperatura (313,15 e 333,15 K) e sete de pressão (100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 bar). Os principais carotenóides identificados nos extratos supercríticos foram licopeno, rubixantina e β-criptoxantina, sendo que a máxima recuperação de carotenóides totais (55 %) foi obtida a 333,15 K e 250 bar, concentrando principalmente o licopeno (78 %) e a rubixantina (74 %). As condições operacionais testadas produziram extratos supercríticos distintos quanto ao rendimento de extração e concentração dos carotenóides, indicando a variação da seletividade do CO₂ com a temperatura e a pressão na extração dos carotenóides de pitanga.

Sánchez-Camargo et al. (2011a) investigaram a extração de ácidos graxos e carotenóides do resíduo de camarão (*Farfantepenaeus paulensis*) em função das condições operacionais (temperatura e pressão) de ESC com CO₂ puro. Como resultados, os autores obtiveram que tanto a temperatura (313,15 a 333,15 K) como a pressão (200 a 400 bar) apresentaram efeitos significativos no rendimento de extração de astaxantina, alcançando 39 % de recuperação deste carotenóide a 316,15 K e 370 bar. Em um trabalho subsequente (Sánchez-Camargo et al., 2011b), os autores avaliaram a aplicação de co-solventes ao CO₂ a fim

de aumentar o rendimento em astaxantina e ácidos graxos EPA e DHA. Os resultados mostraram que a adição de etanol como co-solvente (10%, m/m) permitiu aumentar o rendimento em astaxantina (57,9 %), quando comparado ao uso de CO₂ puro, rendimento esse similar a extração convencional com acetona (63,3 %).

La Fuente et al. (2006) estudaram a solubilidade do licopeno e astaxantina no CO₂ supercrítico em função da temperatura (313,15 a 333,15 K) e pressão (100 a 420 bar). Os resultados indicaram que, de maneira geral, tanto a solubilidade do licopeno como da astaxantina em CO₂ supercrítico aumentaram com a pressão e a temperatura empregadas, variando entre 0,28-1,5 · 10⁻⁶ g/g para o licopeno e entre 0,01-1,2 · 10⁻⁶ g/g para a astaxantina.

Uma das principais características do CO₂ supercrítico é que ele apresenta um poder de solvatação limitado quando se tratam de solutos polares (HAWTHORNE e MILLER, 1987). A ausência de uma longa cadeia polar na estrutura de moléculas como a astaxantina sugere que a solubilidade desta em CO₂ supercrítico possa ser relativamente alta. Entretanto, apesar da estrutura apolar, quando um composto apresenta massa molecular alta, i.e., astaxantina (596,86 g/mol), pode haver uma diminuição da sua solubilidade em CO₂ (DANDGE et al., 1985). Segundo Hawthorne e Miller (1987), a adição de um modificador orgânico pode aumentar substancialmente a eficiência de extração do CO₂ pelo aumento da solubilidade dos analitos, reduzindo suas interações com a matriz ou alterando estas de alguma forma e facilitando a extração. Um co-solvente efetivo é mais polar que o solvente supercrítico e ainda é um bom solvente para o soluto a que se objetiva extrair, como o etanol pressurizado.

Lim et al. (2002) estudaram a separação de astaxantina de *Phaffia rhodozyma* por ESC com velocidade superficiais de CO₂ variando de 0,27 a 0,54 cm/min, pressão de 102 a 500 bar, temperatura de 313,15 a 353,15 K e uso de etanol como co-solvente nas concentrações de 1 a 15 % (v/v). A maior recuperação de carotenóides (85 %, m/m) e astaxantina (90 %, m/m) utilizando CO₂ puro a 0,54 cm/min foi obtida a 313,15 K e 500 bar. O etanol a 15 % proporcionou um aumento no rendimento de astaxantina de 9 e 24 % a 313,15 e 333,15 K, respectivamente, quando se operou a 500 bar. Quando do uso de duas etapas subsequentes de extração, com pressões variando de 300 para 500 bar, a concentração de astaxantina na fração de maior pressão aumentou 4 vezes, a 313,15 K e 10 vezes a 333,15 K, sendo que as concentrações de carotenóides totais nestas frações foram 3,6 a 13 vezes maior, comparativamente à extração convencional utilizando-se acetona.

López et al. (2004) realizaram a extração de astaxantina a partir de crustáceos comparando extração convencional com acetona e ESC com CO₂ puro ou com etanol (5 a 20 %), nas condições de 200 a 350 bar e 313,15 a 333,15 K, em método dinâmico de extração durante 15 a 25 min. O maior rendimento em astaxantina foi obtido a 200 bar, 333,15 K e 15 min, sendo este tempo considerado viável tecnologicamente à obtenção deste pigmento. Segundo os autores a adição de etanol foi indispensável para garantir a extração de astaxantina, sendo a concentração ideal de 15 % de etanol.

Conforme visto, o etanol, um solvente polar, vem sendo utilizado para aumentar a polaridade do CO₂ supercrítico na extração de uma ampla diversidade de compostos. Entretanto, quando os compostos a serem extraídos são apolares, como a maioria dos carotenóides, este co-solvente não é a melhor opção para o aumento da solubilidade destes no CO₂ supercrítico. Além disso, o etanol deve ser removido do produto final, requerendo o uso do calor e, assim, apresentando as mesmas desvantagens de necessidade pós-processamento e possível degradação de compostos termolábeis citadas para a extração convencional (SUN e TEMELLI, 2006).

Em contrapartida, Bamberger et al. (1988) reportaram que a solubilidade de lipídeos menos voláteis em CO₂ supercrítico é significativamente aumentada pela presença de triglicérides voláteis no sistema. Segundo Mendes et al. (1995), para aumentar o rendimento da extração e proteger os carotenóides da degradação, a adição de óleo vegetal como co-solvente ao CO₂ é uma alternativa interessante. Além de todas as vantagens citadas, Krichnavaruk et al. (2008) citam que o uso de óleo vegetal como modificador torna desnecessária a subsequente separação deste do produto. Em contrapartida, o produto obtido usando óleo vegetal como co-solvente o CO₂ supercrítico é diferente ao obtido por co-solventes orgânicos, ou seja, é um produto oleoso enriquecido dos compostos de interesse (no caso, carotenóides) e requer cuidado ao fazer comparações técnicas. De acordo com estas considerações, o óleo vegetal parece ser um bom co-solvente na ESC de carotenóides.

Vasapollo et al. (2004) extraíram licopeno de tomate com CO₂ supercrítico, com e sem a adição de óleo vegetal (de amêndoa, de amendoim, de avelã e de semente de girassol). Os experimentos foram conduzidos variando a temperatura (318,15 a 343,15 K), a pressão (335 a 450 bar) e a vazão de CO₂ (133 a 333 g/min). O óleo de avelã apresentou maiores rendimentos em relação aos demais óleos e ao CO₂ puro, além de ser mais barato e apresentar menor acidez, evitando a degradação do licopeno durante a extração e, por estes fatores foi

considerado o melhor. A maior concentração de licopeno (60 %) foi obtida a 450 bar e 339,15 K com óleo de avelã na concentração de 10 % e vazão de CO₂ de 333 g/min.

Krichnavaruk et al. (2008) investigaram o uso de óleo de soja e azeite de oliva como co-solventes ao CO₂ supercrítico na extração de astaxantina de *Haematococcus pluvialis*. Apenas 25 % da astaxantina presente foi extraída nas condições de 343,15 K e 400 bar sem a adição de co-solventes, enquanto que o uso dos óleos de soja e oliva como co-solventes (10 %) permitiu um aumento de 30 e 80 %, respectivamente, na eficiência de extração de astaxantina. Conforme os autores concluíram, os resultados indicaram maior poder de extração quando utilizados co-solventes como óleo de soja e azeite de oliva na extração a alta pressão de astaxantina a partir de *H. pluvialis*.

2.5 Identificação e quantificação de carotenóides

As determinações de carotenóides de alimentos e de amostras biológicas estão sendo executadas principalmente através de CLAE e espectrometria de massas. Os pigmentos podem absorver luz especificamente na região do ultravioleta e visível do espectro, sendo o restante transmitido ou refletido, gerando as cores características. A estrutura responsável pela absorção da luz é o grupamento cromóforo, que nos carotenóides se caracteriza pelas ligações duplas conjugadas. Cada cromóforo é caracterizado por um espectro de absorção. Assim, a espectroscopia de absorção é uma importante técnica na análise de carotenóides (GROSS, 1991).

A análise por CLAE tem apresentado ampla aplicação na determinação de perfis de carotenóides, sendo que as separações podem ser realizadas utilizando-se colunas de fase reversa (EDELLENBOS et al., 2001; VÁGI et al., 2002; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2003; GÓMEZ-PRIETO et al., 2003; AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004) ou de fase normal (HOLLMAN et al., 1993; ENGLBERGER et al., 2003). Sistemas isocráticos (GAMLIELI-BONSHTAIN et al., 2002; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2003) e em gradientes de eluição (GÓMEZ-PRIETO et al., 2003; AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004) têm sido empregados. Geralmente os métodos de gradiente de solventes alcançam melhor definição quando comparados com sistemas isocráticos, entretanto, apresentam alguns inconvenientes como um maior tempo de análise devido à necessidade de re-equilibrar a coluna após cada injeção (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2003).

Com o desenvolvimento da CLAE, muitos métodos têm sido descritos para separar xantofilas e carotenos. A análise de carotenóides via CLAE utiliza, na sua maioria, detectores de ultravioleta-visível (UV-Vis) ou de arranjo de fotodiodos (HUCK et al., 2000). Quando é requerida alta sensibilidade, a detecção eletroquímica é uma boa alternativa (FERRUZZI et al., 1998). Em matrizes complexas, quando a CLAE de arranjo de fotodiodos não é suficiente para alcançar uma identificação inequívoca dos compostos, o acoplamento desta à espectrometria de massas (EM) usualmente apresenta ótimos resultados (QUEIRÓS e COSTA, 2006).

Com reportado em muitos estudos, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CLAE-EM) é uma ferramenta segura e com alta sensibilidade à identificação de carotenóides (QUEIRÓS e COSTA, 2006). Os métodos de CLAE-EM desenvolvidos para a análise de carotenóides incluem a técnica de ionização química a pressão atmosférica (LACKER et al., 1999; WANG et al., 2000; MURKOVIC et al., 2002; WELLER e BREITHAUPT, 2003) ou ionização por *electrospray* (HADDEN et al., 1999; CARERI et al., 1999). Alguns autores têm utilizado a CLAE-EM para confirmar picos de identificação e purificação em matrizes complexas, como Murkovic et al. (2002) para a determinação de carotenóides presentes em variedades de abóbora.

2.6 Modelagem matemática da ESC

A modelagem matemática de curvas experimentais de ESC pode servir simplesmente para ajustar curvas experimentais ou mesmo para compreender os fenômenos que controlam o processo de ESC. Entretanto, a modelagem tem como principal objetivo determinar os parâmetros ajustáveis dos modelos a partir de dados experimentais, a fim de que estes sejam mantidos constantes na transposição de escala para, então, se obter o *design* do processo em maior escala, como dimensão de equipamento, vazão de solvente, tamanho de partícula (MARTÍNEZ et al., 2003). A partir destes dados é possível a predição da viabilidade econômica dos processos de ESC em uma escala industrial, através da simulação de curvas de extração.

Existe um grande número de modelos matemáticos presentes na literatura para a extração de óleos com CO₂ pressurizado. O processo de extração pode ser analisado e modelado de uma forma simples, considerando-se apenas valores médios dos parâmetros de extração e ajustando o modelo a dados experimentais para determinar os coeficientes desconhecidos. Para uma modelagem mais completa é necessário realizar uma análise aprofundada do mecanismo de extração,

considerando fatores como difusão intraparticular, dispersão axial e radial, transferência de massa através da interface sólido/fluido, resistência à transferência de massa devido a reações químicas e transições de fase (BRUNNER, 1994).

Existem inúmeros modelos matemáticos descritos na literatura e aplicados na ESC de produtos naturais. Dentre eles, pode-se citar: modelos empíricos, modelos baseados na analogia à transferência de calor na partícula, como o de Crank (1975) e o de Gaspar et al. (2003), e modelos baseados na equação diferencial de transferência de massa no leito, como o de Sovová (1994) e de Martinez et al. (2003).

2.6.1 Modelo de Placa (SSP) aplicado por Gaspar et al. (2003)

O modelo de placa, aplicado por Gaspar et al. (2003) para a extração de óleos essenciais usando CO₂ comprimido, considera a transferência de massa na partícula, considerando-se cada partícula sólida em formato de placa como um corpo quente que perde calor com o tempo para o meio, e supondo que as substâncias a serem extraídas encontram-se uniformemente distribuídas na partícula sólida. Neste caso, a partícula sólida esférica é o sólido que contém o óleo a ser extraído e o meio é o solvente supercrítico.

O modelo se trata simplesmente da aplicação da Lei de Fick para a difusão em uma placa, e resolvendo analiticamente o balanço de massa na superfície interna da partícula, a massa de extrato obtida com o tempo é representada pela equação (2.1) (GASPAR et al., 2003):

$$m_{ext} = m_0 \left[1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2} \exp\left(\frac{-D_m(2n+1)^2 \pi^2 t}{\delta^2}\right) \right] \quad (2.1)$$

onde: m_{ext} = massa de extrato (g); m_0 = massa inicial de soluto (g); D_m = difusividade do soluto na matriz sólida (m²/min); t = tempo (min); δ = meia espessura das partículas (placas) (m); n = número inteiro.

2.6.2 Modelo de Sovová (1994)

Sovová (1994) realizou a modelagem de ESC de óleo vegetal, considerando que a estrutura sólida agiria como uma barreira para a extração do soluto. Assim, a moagem da matéria-prima foi realizada, a fim de reduzir o tamanho das partículas sólidas e promover a quebra da parede celular. A suposição adotada por Sovová (1994) considera que a cinética de extração de células rompidas é mais rápida que de células intactas, já que a parede celular confere resistência adicional à transferência de massa. Consequentemente, o mecanismo de transferência de massa nas células rompidas é convecção, enquanto no

núcleo das intactas é difusão molecular. No modelo matemático, Sovová (1994) propôs um termo de transferência de massa considerando uma menor resistência até que as células rompidas estejam esgotadas.

O modelo baseia-se em balanços de massa que consideram o escoamento axial do solvente com velocidade superficial através de um leito fixo de seção transversal cilíndrica. Considera-se que na entrada do extrator o solvente está livre de soluto e temperatura e pressão de operação são mantidas constantes. O tamanho das partículas e a distribuição do soluto no interior do sólido são considerados homogêneos e o soluto encontra-se nas células do sólido, protegido pela parede celular. Devido à moagem, algumas células apresentam sua parede celular rompida tornando parte do soluto exposto ao solvente.

Neste modelo a transferência de massa interfacial ocorre de formas diferentes, dependendo da disponibilidade ou não de soluto de fácil acesso ao solvente. Esta diferença se reflete no termo $J(X,Y)$ do balanço de massa, que representa o fluxo de transferência de massa interfacial.

O modelo de Sovová (1994) emprega o coeficiente de transferência de massa na fase fluída ($k_{Y,a}$) para descrever o período de taxa de extração constante (CER), e o coeficiente de transferência de massa na fase sólida ($k_{X,a}$) para descrever a etapa na qual a resistência à transferência de massa é dominada pela difusão. No modelo de Sovová (1994) o perfil da concentração do soluto na fase fluída é dividido em três etapas, conforme a Figura 2.2:

a) a primeira etapa considera que o soluto de fácil acesso (x_p) disponível na superfície das partículas sólidas vai se esgotando ao longo do leito, chamada etapa CER, onde t_{CER} é o final da etapa de taxa de extração constante (s);

b) na segunda etapa o soluto de fácil acesso vai se esgotando ao longo do leito e começa haver extração de soluto de difícil acesso, chamada etapa FER, onde t_{FER} é o final da etapa de taxa de extração decrescente (s);

c) na terceira etapa são retirados os solutos de difícil acesso (x_k) presentes no interior das partículas sólidas - esta etapa é denominada etapa difusional, sendo controlada pela resistência interna a transferência de massa.

A curva de extração obtida pelo modelo de Sovová (1994) é representada pelas equações (2.2), (2.3) e (2.4), com a massa total de extrato, na saída do extrator, em função do tempo:

$$m(h=H,t) = Q_{CO_2} Y^* [1 - \exp(-Z)] t \text{ para } t \leq t_{CER} \quad (2.2)$$

$$m(h = H, t) = Q_{CO_2} Y^* [t - t_{CER} \exp(Z_w(t) - Z)] \text{ para } t_{CER} < t \leq t_{FER} \quad (2.3)$$

$$m(h = H, t) = N \left[x_0 - \frac{Y^*}{W} \ln \left\{ 1 + \left[\exp \left(\frac{Wx_0}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{N} (t_{CER} - t) \right] \left(\frac{x_k}{x_0} \right) \right\} \right] \text{ para } t > t_{FER} \quad (2.4)$$

onde: h = coordenada axial (m); H = comprimento total do leito (m); t = tempo (s); N = massa de sólido inerte (kg); x_0 = razão mássica de extrato na matéria-prima (kg/kg); Y^* = solubilidade do soluto no solvente (kg/kg); $W = \frac{Nk_{xa}}{Q_{CO_2}(1-\varepsilon)}$; Q_{CO_2} = vazão

de solvente (CO_2) (kg/h); $t_{CER} = \frac{NX_p}{Y^* Z Q_{CO_2}}$; $Z \leq \frac{Nx_0}{Q_{CO_2} t_{CER} Y^*}$;

$$Z_w = \frac{ZY^*}{Wx_0} \ln \left\{ \frac{x_0 \exp \left[\frac{WQ_{CO_2}}{N} (t - t_{CER}) \right] - x_k}{x_0 - x_k} \right\}; \quad x_p = \frac{t_{CER} Y^* Z Q_{CO_2}}{N}; \quad x_k = \text{soluto de}$$

$$\text{difícil acesso (kg/kg)} = x_0 - x_p; \quad t_{FER} = t_{CER} + \frac{N}{Q_{CO_2} W} \ln \left[\frac{x_k + x_p \exp \left(\frac{Wx_0}{Y^*} \right)}{x_0} \right].$$

A curva de ESC resultante desta solução está ilustrada na Figura 2.3, onde a etapa CER é período de taxa de extração constante e a etapa FER é o período de taxa de decrescente de extração.

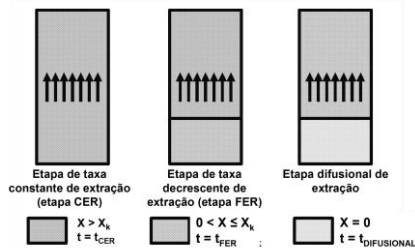
2.6.3 Modelo de Martínez et al. (2003)

Os extratos obtidos com tecnologia supercrítica são misturas de vários compostos, tais como terpenos, flavonóides, fenóis, entre outros. Há situações em que o processo de extração tem como o objetivo a obtenção de um único composto, ou de um grupo específico de compostos presentes na matriz sólida, e não de todos os solúveis. Como exemplo tem-se a descafeinização de café e de chá, sendo o composto de interesse é a cafeína. A modelagem de processos de extração, neste caso, deve levar em conta a variação da composição do extrato ao longo da extração, de forma que se possa otimizar o processo para a obtenção dos compostos de interesse (MARTÍNEZ et al., 2003).

O modelo de Martínez et al. (2003) é um modelo para sistemas multicomponentes e pode ser aplicado considerando o extrato como um pseudocomponente ou uma mistura de substâncias ou grupos de componentes com estrutura química similar. O modelo negligencia o acúmulo e a dispersão na fase fluida devido a este fenômeno não apresentar influência significativa no processo quando comparado com o efeito de convecção.

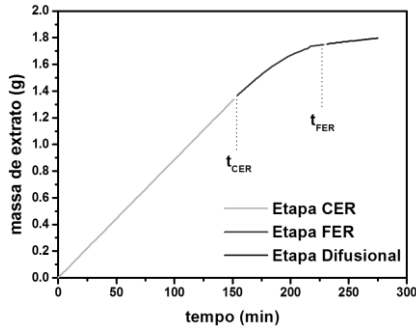
2.7 Viabilidade econômica da extração supercrítica

Unidades de produção tradicionais são compostas de pelo menos dois extratores. Um é descarregado/carregado enquanto o outro conduz a extração. Frequentemente, são preferidas três ou mais configurações de extrator a fim de reduzir os tempos mortos e aumentar a eficiência de extração. Estes extratores são conectados em série, de forma que a matriz e o solvente sejam contatados em contra-corrente. O último extrator das séries é carregado com nova carga de matriz e o primeiro extrator é carregado com a matriz que já foi contatada por um tempo maior com o solvente e que, então, será descarregado. Esta implementação permite a redução da massa de CO₂ requerida para uma determinada extração e, então, tem-se uma produtividade maior e consumo de energia reduzido. Para uma determinada capacidade de produção, aumentando o número de extratores se diminuirá o consumo de energia e os custos operacionais, mas aumentará o custo de investimento. O volume de extrator também depende do número de dias que pode ser operado. A estimativa econômica permite decidir qual é a ótima configuração em cada caso (CLAVIER e PERRUT, 2004).



Fonte: MARTÍNEZ, 2005

Figura 2.2 Etapas de ESC segundo o modelo de Sovová (1994)



Fonte: MARTÍNEZ, 2005

Figura 2.3 Curva de ESC obtida pelo modelo de Sovová (1994)

Para um único grupo de componentes, a curva de extração obtida pelo modelo de Martinez et al. (2003) pode ser representada pela equação (2.5):

$$m_0(h = H, t) = \frac{m_{0i}}{\exp(b_i t_{mi})} \left\{ \frac{1 + \exp(b_i t_{mi})}{1 + \exp[b_i(t_{mi} - t)]} - 1 \right\} \quad (2.5)$$

onde: h = coordenada axial (m); H = comprimento total do leito (m); t = tempo (s); m_0 = massa de soluto (kg); b_i e t_{mi} são parâmetros ajustáveis do modelo (min^{-1} e min, respectivamente).

Devido às extrapolações que ocorrem frequentemente em projetos de extratores considerando apenas a etapa de extração no processo todo, se torna necessário também aperfeiçoar as outras etapas do processo. A recuperação e fracionamento do extrato, administração de energia, melhoria dos procedimentos de descarregamento e carregamento do extrator têm consequências econômicas importantes e devem ser considerados no *design* do processo industrial (CLAVIER e PERRUT, 2004).

Espinosa et al. (2005), realizando a otimização da extração de concentrado de linalol a partir de casca de laranja, calcularam o lucro líquido baseado na resolução da equação (2.6), utilizando software Fortran:

$$\begin{aligned} \text{Lucro Líquido} = & (\text{preço} * \text{produção})_{\text{aroma}} + (\text{preço} * \text{produção})_{\text{limoneno}} - \\ & - (\text{custo} * \text{consumo})_{\text{óleo_laranja}} - \sum (\text{custos operacionais}) - \sum (\text{custos investimento}) \end{aligned} \quad (2.6)$$

Segundo Rosa e Meireles (2005), o custo de manufatura (COM) pode ser determinado pela soma do custo direto, do custo fixo, e de

despesas gerais. Os custos diretos são diretamente dependentes da taxa de produção e são compostos pelos custos da matéria-prima, dos operadores, de utilidades, etc. Os custos como taxas territoriais, seguros, depreciação, etc., não são dependentes da taxa da produção e são denominados custos fixos. As despesas gerais são associadas à manutenção do negócio e incluem custos administrativos, de vendas, de pesquisa e desenvolvimento, entre outros. Na estimativa do COM dos extratos obtidos por extração supercrítica, os autores utilizaram a metodologia apresentada por Turton et al. (1998). Os três componentes do COM são estimados em termos de cinco custos principais: matéria-prima, operadores, utilidades, tratamento de resíduo e investimento inicial. Cada um destes custos tem um peso na composição de COM, conforme a equação (2.7):

$$COM = 0,304FI + 2,73COL + 1,23*(CUT + CWT + CRM) \quad (2.7)$$

onde: COM = custo de manufatura; FI = fração de investimento; COL = custo com operadores; CUT = custo de utilidades; CWT = custo com tratamento de resíduos; CRM = custo da matéria-prima.

2.8 Precipitação e encapsulamento de compostos bioativos

Devido à sua estrutura altamente insaturada, a astaxantina sofre rapidamente oxidação quando exposta ao ar, podendo perder valor nutritivo, propriedades biológicas e tecnológicas. Para ser empregada em produtos comerciais, se faz necessário, portanto, que a astaxantina seja estabilizada, como por exemplo, através de encapsulamento em polímeros (HIGUERA-CIAPARA et al., 2004).

A necessidade de se obter produtos de alta qualidade utilizando tecnologias de produção menos ofensivas ao ambiente constitui o principal foco de estudos em diversos ramos da pesquisa. Atualmente, o campo da nanotecnologia vem recebendo pronunciada atenção no desenvolvimento de novos processos e na obtenção de materiais com propriedades e características desejáveis em diversos segmentos industriais, tais como: catalisadores, materiais cerâmicos, corantes alimentícios, biopolímeros, pigmentos, fármacos, entre outros (MARTÍN et al., 2007).

Do ponto de vista tecnológico, para a formação de partículas, geralmente utilizam-se técnicas clássicas de precipitação como a moagem ultrafina, *spray drying*, liofilização e precipitação com anti-solventes líquidos. A funcionalidade e as propriedades de aplicação de um material micro ou nano-particulado são altamente dependentes do

tamanho da partícula, da distribuição de tamanho de partícula e da morfologia da partícula. Porém, estas técnicas convencionais de produção de materiais na faixa nanométrica e/ou micrométrica, além de não permitirem o controle de tamanho das partículas formadas, associam-se ao uso de solventes orgânicos que conduzem a índices residuais elevados, além de conferir toxicidade ao produto final. Ainda, por *freeze-drying* são produzidas partículas com larga distribuição de tamanho e o emprego de *spray drying* pode resultar na perda significativa da atividade biológica devido às altas temperaturas empregadas, tornando a técnica pouco atrativa para a precipitação de compostos termo-sensíveis (HE et al., 2007). Nas técnicas citadas acima encontramos os seguintes pontos desfavoráveis: ausência de controle do tamanho e distribuição das partículas; uso excessivo de solventes orgânicos, que acarretam em grandes concentrações residuais no produto final; altos custos de operação; necessidade de etapas de pós-processamento; degradação térmica e química do soluto; baixos rendimentos e eficiência de encapsulamento.

Nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos, as formulações na faixa micrométrica vêm sendo amplamente utilizadas com o intuito de aumentar a qualidade e a vida de prateleira dos alimentos. Essas formulações mantêm os princípios ativos dos compostos de interesse protegidos contra reações de decomposição por um tempo maior, além de controlar a taxa de liberação no produto onde são adicionados. Geralmente, estas formulações têm o propósito de promover uma ação benéfica à saúde humana, como anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante ou anti-inflamatória (HERRERO et al., 2005). Além disso, a reposição da cor em alimentos perdida durante o processamento e armazenamento, foto proteção e a adição de compostos químicos que conferem aroma (SANCHÉZ-CONTRERAS et al., 2000) são altamente desejáveis em diversos produtos industrializados, a fim de manter e/ou realçar suas características particulares. Porém, muitos destes compostos são suscetíveis às influências externas como calor, luz, ácidos, oxidação enzimática e não-enzimática, presença de oxigênio e enzimas, metais e emprego de altas temperaturas (SCHROEDER e JOHNSTON, 1995).

Outro fator relevante é que partículas de tamanho micrométrico e/ou nanométrico apresentam elevada área superficial, ocasionando maior degradação destes compostos. Isto torna fundamental o aprimoramento de técnicas de preservação que garantam a máxima ação e aproveitamento destas substâncias. Uma forma de promover maior estabilidade a compostos ativos com relevante aplicação industrial é

através de encapsulamento, onde geralmente emprega-se um biopolímero como agente encapsulante. Dentre estes, o ácido polilático, a policaprolactona, o polietilenoglicol e o poli-idroxibutirato destacam-se por apresentarem biocompatibilidade e biodegradabilidade. Ainda, além do papel de proteção, o tipo de polímero utilizado estabelece se o mesmo será liberado através de difusão (pelos poros ou cadeias do polímero) ou por degradação (dada quando o polímero degrada dentro da matriz alimentícia, resultado de processos biológicos naturais) (WANG, et al., 2000). Nesta etapa, a formação de micro ou nanocápsulas é realizada através de duas maneiras: formação de uma fina camada de polímero recobrando o composto ou pela co-precipitação do polímero onde várias partículas do composto encontram-se inseridos no interior da partícula de polímero. Basicamente, o encapsulamento ocorre quando o material a ser encapsulado é posto em suspensão em uma solução polimérica e então o polímero dissolvido é precipitado recobrando o material em suspensão (KALOGIANNIS et al., 2006).

Através de técnicas clássicas para a formação de partículas e encapsulamento de compostos bioativos não se obtém um controle de tamanho e morfologia das partículas e verifica-se baixa eficiência na etapa de encapsulamento. Portanto, é importante que técnicas alternativas sejam desenvolvidas com o objetivo de suprir as limitações provenientes dos métodos convencionais, promovendo a precipitação e encapsulamento de materiais sólidos com características controladas (tamanho e distribuição de tamanho, morfologia e estrutura cristalina).

Atualmente, o emprego de fluidos pressurizados na obtenção de partículas utilizadas para o encapsulamento de princípios ativos em matrizes poliméricas vem sendo fonte de pesquisas em diversos setores industriais e acadêmicos. Estes fluidos, em estado sub ou supercríticos, fornecem partículas na ordem nano ou micrométrica, com estreita distribuição de tamanho, além de altas porcentagens de encapsulamento (KALOGIANNIS et al., 2006). Segundo Fages et al., (2004) diversas vantagens advindas do emprego de fluidos supercríticos, dependendo da configuração do processo, podem ser citadas como: alta pureza dos produtos, controle do polimorfismo dos cristais, possibilidade de processar moléculas termos sensíveis, processo em um único estágio e ambientalmente aceitável. Várias técnicas baseadas em fluidos supercríticos têm sido propostas no sentido de explorar as características de manipulação do poder solvente e da alta difusividade que são peculiares dos fluidos nas proximidades do ponto crítico (REVERCHON et al., 2003).

O uso de fluidos sub ou supercríticos como solventes ou anti-solventes na produção de partículas foi demonstrado por diversos pesquisadores como útil na modificação das propriedades de materiais como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, hábito cristalino e morfologia. Estas características de partícula podem ser modificadas pelo controle do poder solvente do fluido sub ou supercrítico que é efetuado pela manipulação da temperatura e/ou pressão do sistema (MIGUEL et al., 2008; COCERO et al., 2009). Outra característica destas técnicas reside na eficiente separação do solvente e do anti-solvente das partículas após a precipitação. É possível, então, evitar resíduos de solventes no produto e oferecer um reaproveitamento potencialmente vantajoso do solvente e do anti-solvente (RANTAKYLA et al., 2002).

As técnicas de recristalização que empregam fluidos pressurizados são denominadas de RESS (Rápida Extensão de Soluções Supercríticas) que emprega o fluido como solvente; o método PGSS (Partículas a partir de Soluções Saturadas de Gás) utiliza os fluidos pressurizados como solutos, enquanto o processo GAS (Gás Anti-Solvente) utiliza o fluido pressurizado como anti-solvente. Esta última possui algumas variantes, dependendo do modo com que o anti-solvente e a solução orgânica contendo o material a ser precipitado são postos em contato, gerando a técnica SAS (Anti-Solvente Supercrítico), a PCA (Precipitação com Anti-solvente Comprimido), a ASES (Sistema de Extração de Solvente em Aerossol) e a SEDS (Dispersão da Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos) (FRANCESCHI et al., 2009; MATTEA et al., 2009a; MATTEA et al. 2009b). Nestas variações, o anti-solvente supercrítico pode ser facilmente e totalmente removido do produto final pela redução da pressão. No caso do CO₂ supercrítico ser o anti-solvente utilizado, o processo pode ser conduzido em faixas de temperatura e pressão próximas as condições ambientais, prevenindo degradações térmicas e oxidação do produto final, já que o produto precipitado está sob ação de uma atmosfera inerte (COCERO e FERRERO, 2002).

O CO₂ é um fluido amplamente utilizado no campo da tecnologia supercrítica e seu uso como solvente vem sendo estudado continuamente desde 1950. Nas últimas décadas o foco da tecnologia supercrítica utilizando o CO₂ como solvente esteve centrado em processos de extração e fracionamento. Porém, a formação de “neve” através da expansão de uma solução binária foi inicialmente observada por Hannay e Hogarth em 1879. Este trabalho pode ser considerado um marco inicial a respeito da formação de partículas. Trabalhos mais recentes mostram a possibilidade da utilização da tecnologia supercrítica na

obtenção de materiais sólidos micro ou nanoparticulados de interesse em indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas. He et al. (2006) ao estudarem a eficiência da etapa de atomização, pureza e influência das variáveis de operação no processo de formação de micropartículas de carotenóides naturais com CO₂ supercrítico, verificaram que pequenas e estreita distribuição de tamanho das partículas de carotenóides podem ser obtidas de acordo com a metodologia empregada. Reverchon e Spada (2004) estudaram a produção de micropartículas de eritromicina através de atomização com fluidos supercríticos, avaliando a influência das variáveis de processo e de diferentes solventes líquidos (metanol, etanol, acetona) na morfologia, no tamanho e distribuição de partícula. Como resultados, o processo permitiu produzir partículas na ordem micrométrica, as partículas permaneceram mais estáveis e foram detectados poucos traços residuais de solvente nas micropartículas de eritromicina formadas.

Na literatura científica são apresentadas variadas técnicas utilizando fluidos pressurizados para a precipitação de diferentes materiais incluindo princípios ativos e polímeros. Bahrami e Ranjbarian (2007) apresentaram uma revisão sobre a produção de micro e nanocompostos utilizando dióxido de carbono supercrítico.

Mattea et al. (2009a) apresentaram uma tecnologia promissora de produzir nano-partículas de substâncias naturais usando fluidos supercríticos em combinação com nano-emulsões, a extração supercrítica de emulsões (SFEE - *Supercritical Fluid Extraction of Emulsions*, também chamado de SAS de emulsões por ser uma variação do processo SAS). Esse processo consiste em extrair o solvente orgânico das gotas de uma emulsão óleo-em-água pelo CO₂ supercrítico e apresenta vantagens perante o SAS convencional, como a possibilidade de regular o tamanho das partículas através das características geométricas das fases da emulsão podendo-se chegar à ordem nanométrica (MATTEA et al., 2009a). Cocero et al. (2009) realizaram uma ampla revisão dos fundamentos e aplicações dos processos de precipitação e encapsulamento utilizando fluidos supercríticos.

2.9 Considerações sobre o Estado da Arte

Segundo a revisão bibliográfica apresentada neste documento, um futuro promissor está reservado para a área alimentícia e nutracêutica na obtenção e uso de aditivos naturais a partir de subprodutos da indústria alimentícia, bem como a produção de partículas estáveis destes na ordem nano/micrométrica. Através dos processos extrativos convencionais, verificam-se inúmeras limitações dos produtos obtidos

como, por exemplo, a diminuição da qualidade dos produtos causada pelas altas temperaturas empregadas, presença de resíduos de solvente, entre outras, restringindo sua aplicação segura em produtos alimentícios. Neste mesmo sentido, as técnicas convencionais de precipitação/encapsulamento utilizam grandes quantidades de solventes e/ou não possuem controle adequado sobre a morfologia, o tamanho e as características das partículas formadas, necessários para determinar sua funcionalidade e aplicabilidade. Em contrapartida, a tecnologia supercrítica aplicada a extração e encapsulamento de compostos apresentam inúmeras vantagens quanto a qualidade dos extratos/produtos precipitados, permitindo o controle efetivo das propriedades de interesse a partir de intensa investigação a respeito das variáveis envolvidas.

No caso da extração supercrítica, estudos relacionados à obtenção de compostos de interesse para a indústria de fármacos, alimentos e cosmética, vêm sendo intensamente publicados na literatura, com aplicações industriais já consolidadas. Em contrapartida, investigações envolvendo resíduos de processamento de alimentos com objetivo de agregar valor a um subproduto vêm se desenvolvendo apenas na última década e são de grande interesse para a indústria de alimentos. Já no caso do processo de co-precipitação em meio supercrítico, nenhuma unidade está em funcionamento com este objetivo e os estudos relacionados vêm se desenvolvendo apenas nos últimos anos. Especificamente relacionado com a co-precipitação de extratos ou sistemas multicomponentes, apenas um trabalho está disponível na literatura (VARONA et al., 2010).

Dentro deste contexto, a utilização de fluidos sub ou supercríticos como solventes para extração de compostos com alto valor, como o caso dos carotenóides, a partir de um resíduo de processamento de alimentos, como o resíduo de camarão, otimizando o processo extrativo em função de suas variáveis operacionais, obtenção de parâmetros para uso em predição do processo em escalas maiores, bem como uma estimativa dos custos do processo, é de grande interesse para a comunidade científica e industrial, pois se trata de um processo atraente quanto à alta qualidade do produto final. Da mesma forma, a utilização de fluidos sub e supercríticos como anti-solvente na precipitação e encapsulamento de extratos com alto valor, como o caso do extrato carotenóidico obtido neste trabalho a partir de resíduo de camarão, em polímeros mostra-se uma tecnologia atraente, não só pelos fatores de qualidade e segurança ambiental envolvidos, como também visando ao alcance do objetivo de

proteger o extrato de deterioração por oxigênio, luz e calor, garantindo suas funcionalidades e aplicação.

2.10 Referências

- ABCC- Associação Brasileira de Criadores de camarão (2000). Disponível em: <www.abccam.com.br/agronegocio/breve.htm>. Acesso em 12.abr.2008.
- AKSU, Z; EREN, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2985 – 2991, 2005.
- AKSU, Z; EREN, A.T. Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107 – 113, 2007.
- ALGA TECHNOLOGIES. Disponível em: <<http://algatech.com/>>. Acesso em 05.fev.2009.
- ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P. C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**, v. 82, p. 575-582, 2003.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2. ed., Viçosa: UFV, 1999.
- ARIMA, H.K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from North-eastern Brasil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 40, p. 284-292, 1990.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 16, p. 647–657, 2003.
- ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 406-413, 1997.
- AZEVEDO-MELEIRO, C.H., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 17, p. 385–396, 2004.
- BABU, C. M. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. **LWT**, v. 41, p. 227–235, 2008.
- BAMBERGER, T. et al. Measurement and model prediction of solubilities of pure fatty acids, pure triglycerides, and mixtures of triglycerides in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering Data**. v. 33, p. 327-333, 1988.
- BAHRAMI, M.;RANJBARIAN, S.Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, n. 2, p. 263-283, 2007.
- BATAILLE, M. P.; BATAILLE, P. F. Extraction of proteins from shrimp processing waste. **Journal Chemistry and Tecnology Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 303 – 208, 1983.
- BELL, J. G. et al. Depletion of α -Tocopherol and Astaxanthin in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Autoxidative Defense and Fatty Acid Metabolism. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1800, 2000.

- BHOSALE, P; Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 351 – 361, 2004.
- BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutrition Cancer**, v. 18, p. 1-29, 1992.
- BOTELLA-PAVÍA, P; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiology Plant.**, v. 126, p. 369 – 381, 2006.
- BOTTINO, N. R.; LILLY, M. L.; FINNE, F. Fatty acid stability of gulf of Mexico brown shrimp (*Penaeus aztecus*) hold on ice and in frozen storage. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1778 -1779, 1979.
- 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, 1997.
- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUEZ-AMAYA. Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergir*) and wild warine shrimp (*Penaeus brasiliensis*); *Penaeus schimitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 359 - 369, 2001.
- BRITTON, G. In: In: LAW, J.H., RILLING, H.C. (Eds.), **Methods in Enzymology**. Academic Press, New York, 1985.
- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. v.4. Darmstadt: Steinkopff, 1994.
- CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 163-170, 2005.
- CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Liquid chromatographyelectrospray mass spectrometry of b-carotene and xanthophylls: validation of the analytical method. **Journal of Chromatography A**. v. 854, p. 233-244, 1999.
- CHEN, H.M.; MEYERS, S. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1516 –1520, 1555, 1982.
- CHEN, H. M.; MEYERES, S. P.; HARDY, R. W.; BIEDE, S. L. Color stability of astaxanthin pigmented rainbow trout under various packaging conditions. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 9, p. 1337-1340, 1985.
- CHEN, C. LIAU, W.; TSAI, G. Antibacterial effects os N-sulfonated and Nsulfobenzovi chitosan and applications to oyster preservation. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 1124 -1128, 1998.
- CHOUBERT, G.; LUQUET, P. Utilization of shrimp meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) pigmentation. Influence of fat content of the diet. **Aquaculture**, v. 32, p. 19-26, 1983.
- CCTTMAR - UNIVALI. Centro de Ciência Tecnológica da terra e do mar –Universidade do vale do Itajaí 2000. Disponível em<www.gep.ctmar.univali.br/sub_pesq/camarão.html> Acesso em: 12.abr.2008.
- CLAVIER, J-Y.; PERRUT, M. **Scale-Up Issues for Supercritical Fluid Processing in Compliance with GMP**. France: Champigneulles, 2004. 37 p.

COCERO, M. J.; FERRERO, S. Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch. Effect of operating conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 237-245, 2002.

COCERO, M. J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; SALIMA, V. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.

CRANK, J. **The mathematics of diffusion**. Clarendon Press: Oxford, 1975. 85 p.

DANDGE, D.K.; HELLER, J.P.; WILSON, K.V. Structure solubility correlations: organic compounds and dense carbon dioxide binary systems. **Industrial Engineering and Chemical Production: Research and Development**. v. 24, p. 162-166, 1985.

DE SIO, F.; SERVILLO, L. LOIUDUCE, R., LARATTA, B.; ASTALDO, D. A chromatographic procedure for the determination of carotenoids and chlorophylls in vegetable products. **Acta Alimentaria**, v. 30, p. 395-405, 2001.

DELGADO-VARGUS, F., JIMENEZ, A.R., PEREDES-LOPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains: characteristics, biosynthesis, preparation and stability. **CRC Critical Reviews on Food Science and Nutrition**. v. 40, p. 173-289, 2000.

DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ Extration and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.54, n. 7, p. 2441-2469, 2006.

DOS PASSOS, R. **Extração e caracterização química de carotenóides provenientes de biomassas de interesse para a aquicultura**. Florianópolis, 2007. Tese de Doutorado em Ciência em Alimentos –Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2007.

DYERBERG, J. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. **Nutrition Reviews**, v. 44, n.4, p. 125 -134, 1986.

EDELENBOS, M.; CHRISTENSEN, L. P.; GREVSEN, K. HPLC determination of chlorophyll and carotenoid pigments in processed green pea cultivars (*Pisum sativum* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 49, p. 4768-4774, 2001.

EDGE, R.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. The carotenoids as anti-oxidants – a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 41, p. 189-200, 1997.

ENGLBERGER, L.; SCHIERLE J.; MARKS, G.C.; FITZGERALD, M.H. Micronesian banana, taro, and other foods: newly recognized sources of provitamin A and other carotenoids. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 16, p. 3-19, 2003.

ESPINOSA, S.; DIAZ, M. S.; BRIGNOLE, E. A. Process optimization for supercritical concentration of orange peel oil. **Latin American Applied Research**. v. 35, n. 4, p.321-326, 2005.

ESSIEN, E. U. Lipid content and fatty acids profiles of some lesser known Nigerian foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 19, p. 153 -159, 1995.

FAGES, J.; LOCHARD, H.; LETOURNEAU, J.-J.; SAUCEAU, M.; RODIER, E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. **Powder Technology**, v. 141, n. 3, p. 219-226, 2004.

FAMINO, A. O.; ODUGUWA, O. O.; ONIFADE, A. O.; OLOTUNDE, T. O.. Protein quality of shrimp-waste meal. **Bioresource Technology**, v.72, n.1, p.185-188, 2000.

- FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. FISHSTAT, Rome, 2010.
- FAZELI, M. R.; TOFIGHI, H.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, J. Effects of salinity on β -carotene production by *Dunaliella* DCCBC26 isolated from Urmia salt lake, north of Iran. **Bioresource Technology**. v.97, N. 18, p.2453–2456, 2006.
- FERRUZZI, M.G.; SANDER, L.C.; ROCK, C.L.; SCHWARTZ, S.J. Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with a coulometric electrochemical array detector. **Analytical Biochemistry**. v. 256, p. 74–81, 1998.
- FILHO, G. L.; ROSSO, V. V. D.; MEIRELES, M. A. A.; ROSA, P. T. V.; OLIVEIRA, A. L.; MERCADANTE, CABRAIL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 36-39, 2008.
- FOOD AND DRUG REGULATION. Disponível em: <<http://laws.justice.gc.ca/en/F-27/C.R.C.-c.870/124366.html#rid-12437>>, Department of justice, Canada, 2005.
- FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 4, p. 656-663, 2009.
- FRANÇA, L. F.; REBER, G.; MEIRELES, M. A. A.; 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.
- GAMLIELI-BONSHEIN, I.; KORIN, E.; COHEN, S.. Selective separation of cis–trans geometrical isomers of β -Carotene via CO₂ supercritical fluid extraction. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, p. 169–174, 2002.
- GASPAR, F.; LU, T.; SANTOS, B.; AL-DURIN, B. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**. v.25. n. 3, p.247-260, 2003.
- GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8 - 9, p. 809 - 812, 2001.
- GOMES, F. S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**. v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.
- GÓMEZ-PRIETO, M.S.; CAJA, M. M.; HERRAIZ, M.; MARÍA, G. S. Supercritical fluid extraction of all-*trans*-Lycopene from tomato. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 3–7, 2003.
- GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**, New York, Published by Van Nostrand Reinhold, 1991.
- GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y.; CHEN, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT**. v. 41, p. 1082–1088, 2008.
- GUILLOU, A.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. **Aquaculture**, v.130, p. 351 - 360, 1995.
- HADDEN, W. L.; WATKINS, R. H.; LEVY, L. W.; REGALADO, E.; RIVADENEIRA, D. M.; VAN BREEMEN, R. B.; SCHWARTZ, S. J. Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 47, p. 4189–4194, 1999.

HAEGELE, A. D.; GILLETTE, C.; O'NEILL, C.; WOLFE, P.; HEIMENDINGER, J.; SEDLACEK, S. Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 9, n. 4, p. 421-425, 2000.

HANNAY, J.B.; HOGARTH, J., **On the Solubility of Solids in Gases**, Proc. Roy. Soc., (London). Ed. 29, 1879.

HAWTHORNE, S. B.; MILLER, D. J. Extraction and Recovery of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Environmental Solids Using Supercritical Fluids. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1705-1708, 1987.

HE, W. Z.; SUO, Q. L.; HONG, H. L.; LI, G. M.; ZHAO, X. H.; LI, C. P.; SHAN, A. Supercritical Antisolvent Micronization of Natural Carotene by the SEDS Process through Prefilming Atomization. **Industrial Engineering and Chemical Research**, v. 45, n. 6, p. 2108-2115, 2006. **Crystal Research and Technology**, v. 42, n. 6, p. 631-638, 2007.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**. v. 93, n. 3, p. 417-423, 2005.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUELLES-MONAL, W. Mienapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 41-45, 2004.

HOLANDA, H. D. **Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos**. Campinas, 2004. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2004.

HOLLMAN, P.C.H.; SLANGEN, J. H.; WAGSTAFFE, P. J.; FAURE, U. Intercomparison of methods for the determination of vitamins in foods. Part 1. Fat-soluble vitamins. **Analyst**. v. 118, p. 475-480, 1993.

HU, Z-C; ZHENG, Y-O; WANG, Z.; SHEN, Y-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 586-590, 2006.

HUCK, C. W.; POPP, M.; SCHERZ, H.; BONN, G. K. Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 38, p. 441-449, 2000.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2006 Brasil**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: Ibama, 2008.

JACQUES, R. A. **Caracterização química da erva mate (*Ilex paraguariensis*) aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. Porto Alegre, 2005. Tese de Doutorado em Química – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2005.

JOHNSON, E. A.; AN, G. H. Astaxanthin from microbial sources. **Critical Review on Biotechnology**, v. 11, p. 297-326, 1991.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 18374 – 18379, 1995.

- KAISER, P.; SURMANN, S.; VALLENTIN, G.; FUHRMANN, A. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. **Journal of Microbiology Methods**. v. 70, p. 142–149, 2007.
- KALOGIANNIS, C. G.; MICHAILOF, C. M.; PANAYIOTOU, C. G. Microencapsulation of Amoxicillin in Poly(L-lactic acid) by Supercritical Antisolvent Precipitation. **Industrial Engineering and Chemical Research**, v. 45, n. 25, p. 8738–8743, 2006.
- KARDINAAL, A.F.M.; KOK, F.J.; RINGSTAD, J.; GOMEZ-ARACENA, J.; MAZAEV, V.P.; KOHLMEIER, L.; MARTIN, B.C.; ARO, A.; KARAK, J.D.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; RIEMERSMA, R.A.; VEER, P.; HUTTUNEN, J.K.; MARTIN; MORENO, J.M. Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC study. **Lancet**. v. 342, p. 1379–1384, 1993.
- KLAUI, H.; BAURERNFEIND, J. C. Carotenoids as food colors. In: **Carotenoids and colorants and vitamin a precursors**. BAURERNFEIND, J. C., Ed, Academic Press, Nova York, 1981.
- KLUGE, J.; FUSARO, F.; CASAS, N.; MAZZOTTI, M.; MUHRER, G. Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: I. Encapsulation of lysozyme, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 50, p. 327–335, 2009.
- KOPAS, L. M.; WARTHESEN, J. J. Carotenoid photostability in raw spinach and carrots during cold storage. **Journal of Food Science**. v. 60, p. 773–776, 1995.
- KRICHNAVARUK, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; PAVASANT, P. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus p.* with vegetable oils as co-solvent. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 5556–5560, 2008.
- LA FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**. v. 247, p. 90–95, 2006.
- LACKER, T.; STROHSCHIEIN, T.; ALBERT, K. Separation and identification of various carotenoids by C30 reversed-phase highperformance liquid chromatography coupled to UV and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 854, p. 37–44, 1999.
- LAMBERSTEN, G.; BRAEKKAN, O. R. Method of analysis of astaxanthin and its occurrence in some marine products. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 22, p. 99–101, 1971.
- LI, H.; TYNDALE, S.J.; HEATH, D.D.; LETCHER, R.J. Determination of carotenoids and all-trans-retinol in fish eggs by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v. 816, p. 49–56, 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.
- LÓPEZ, M.; ARCE, L.; GARRIDO, J.; RÍOS, O.; VALCÁRCCEL, M. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. **Talanta**, v. 64, p. 726–731, 2004.
- LUQUE-GARCÍA, J. L.; DE CASTRO, M. D. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41–47, 2003.

- MACHMUDAH, S.; KAWAHITO, Y.; SASAKI, M.; GOTO, M. Process optimization and extraction rate analysis of carotenoids extraction from rosehip fruit using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 308–314, 2008.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; LA OSSA, E. M.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylla from *Synechococcus* sp. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 323-329, 2007.
- MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; LA OSSA, E. M.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophylla from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948-952, 2009.
- MATOS, H.R.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. **Archives on Biochemistry and Biophysics**, v. 383, p. 56-59, 2000.
- MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 65 – 70, 2007.
- MANDEVILLE, S.; YAYLAYAN, V.; SIMPSON. Proximate Analysis, isolation and identification of amino acids and sugars from raw and cooked commercial shrimp waste. **Food Biotechnology**, v. 6, n.1, p. 51 – 64, 1992.
- MARASCO, E; SCHIMDT-DANNERT, C. Towards the biotechnological production of aroma and flavour compounds in engineered microorganisms. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v. 1, n. 3, p. 145 – 157, 2003.
- MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**. v. 52, p. 487-496, 2007.
- MARTÍN, A.; MATTEA, F.; GUTIÉRREZ, L.; MIGUEL, F.; COCERO, M. J. Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical anti-solvent process, **Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, p. 138–147, 2007.
- MARTÍNEZ, J. **Extração de Óleos Voláteis e Outros Compostos com CO₂ Supercrítico: Desenvolvimento de uma Metodologia de Aumento de Escala a partir da Modelagem Matemática do Processo e Avaliação dos Extratos Obtidos**. 2005. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent Model To Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial Engineering of Chemistry Research**. v. 42, p. 1057-1063, 2003.
- MARTÍNEZ, J.; ROSA, P. T. V; MENUT, C.; LEYDET, A.; BRAT, P.; PALLET, D.; MEIRELES, M. A. A. Valorization of Brazilian Vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 6578-6584, 2004.
- MATTEA, F.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J.. Carotenoid processing with supercritical fluids, **Journal of Food Engineering**, v. 93, p. 255–265, 2009a.
- MATTEA, F.; MARTÍN, A.; MATÍAS-GAGO, A.; COCERO, M. J. Supercritical antisolvent precipitation from na emulsion: β -carotene nanoparticle formation. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2009b (in press).

- MEIRELES, M.A.A. Supercritical Extraction from Solid: Process Design Data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**. v. 7, p. 321-330, 2003.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. A. A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 51, p. 4219-4224, 2003.
- 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.
- MENDES, R. L.; NOBRE, P.; CARDOSO, M. T.; PEREIRA, A. P.; PALAVRA, A. F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**. v. 356, p. 328-334, 2003.
- MEYERS, S. P. Utilization of shrimp processing wastes. **INFOFISH Marketing Digest**. n.4, p. 18 - 21, 1986.
- MEYERS, S. P.; BLIGH, D. Characterization of Astaxanthin Pigments from Heat-Processed Crawfish Waste. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 29, n. 3, p. 505 - 508, 1981.
- MICHELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 33, p. 131-138, 2005.
- MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; COCERO, M.J. Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 9-10, p. 1594-1602, 2008.
- MOELLER, S.M.; JACQUES, P.F.; BLUMBERG, J.B. The potential role of dietary xanthophylls in catarat and age-related macular degenerat. **Journal of American College on Nutrition**, v. 19, p. 522S-527S, 2000.
- MURKOVIC, M.; MULLEDER, U.; NEUNTEU, H. Carotenoid content in different varieties of pumpkins. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 15, p. 633-638, 2002.
- NEGRO, J. J.; GARRIDO-FERNANDEZ, J. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding on introduced crayfish (*Procambarus clarkii*). **Comparative Biochemistry and Physiology part B**, v. 126, n. 3, p. 347 -352, 2000.
- NIIZU, P. Y. **Fontes de Carotenóides Importantes para a Saúde Humana**. Campinas, 2003. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2003.
- NUNES, A. J. P. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. **Panorama da AQUICULTURA**, v. 11, p. 29-33, 2001.
- 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. 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.

- OLIVIER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543 – 555, 2000.
- OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 49, p. 7S-11S, 1999.
- PAIVA, S.A.R.; RUSSELL, R.M. beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of American College in Nutrition**, v. 18, p. 426-433, 1999.
- OMARA-ALWALA, T. R.; HVEI, M.E.I.; CHEN; ITO, Y.; SIMPSON, K. L.; MEYERS, S. P. Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.33, n. 2, p. 260 - 263, 1985.
- ORNUM, J. V. Shrimp waste-must it be wasted? **INFOFISH International**, v. 6, p. 48-53, 1992.
- PAIVA, S. A. R.; RUSSELL, R. M. β -carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of American College of Nutrition**. v. 18, p. 426-433, 1999.
- PANGANTIHON-KULHMANN, M. P.; MILLAMENA, O.; CHERN, Y. Effect of dietary astaxanthin and vitamin A on the reproductive performance of *Penaeus monodon* broodstock. **Aquatic Living Resources**, v.11, n.6, p. 403 – 409, 1998.
- PERDIGÃO, N. B.; VASCONCELOS, F. C.; CINTRA, I. H. A.; OGAWA, M. Extração de carotenóides de carapaças de crustáceos em óleo. **Boletim Técnico Científico da CEPENE**, v. 3, n. 1, p. 234-246, 1995.
- QUEIRÓS, A. R-B.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, p. 97–111, 2006.
- RANTAKYLÄ, M.; JÄNTTI, M.; AALTONEN, O.; HURME, M. The effect of initial drop size on particle size in the supercritical antisolvent precipitation (SAS) technique. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, n. 3, p. 251-263, 2002.
- RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. **Nutrition Research**. v. 19, p. 305-323, 1999.
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; CAPUTO, G.; DELLA PORTA, G. Pilot scale micronization of amoxicillin by supercritical antisolvent precipitation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 26, n. 1, p. 1-7, 2003.
- REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 38, p.146-166, 2006.
- REVERCHON, E.; SPADA, A. Erythromycin micro-particles produced by supercritical fluid atomization. **Powder Technology**, v. 141, n. 1-2, p. 100-108, 2004.
- ROCK, C.L. Carotenoids: Biology and treatment. **Pharmacology Therraphy**, v. 75, p. 185-197, 1997.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Assessment of the provitamin A contents of foods—the Brazilian experience. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 9, pp. 196–230, 1996.
- ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994–2003). **Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 109–117, 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.
- SACHINDRA, N.M.; MAHENDRAKAR, N.S. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetal oils. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1195-1200, 2005.

- SAITO, A.; REGIER, L. W. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **Journal Fish Research**, v. 28, p. 509 - 512, 1971.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MARTINEZ-CORREA, H. A.; PAVIANI, L. C.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, n. 2, p. 164-173, 2011a.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MEIRELES, M. A. A.; LOPES, B. L. F.; CABRAL, F. A. Proximate composition and extraction of carotenoids and lipids from Brazilian redspotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). **Journal of Food Engineering**, v. 102, n. 1, p. 87-93, 2011b.
- SANCHÉZ-CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, M. SANCHEZ, S. Bioconversion of lutein to products with aroma. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 528 – 534, 2000.
- SCHROEDER, W.A.; JOHNSTON, E.A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodoxyma*. **Journal of Biogoy and. Chemistry**, v. 270, p. 18374–18379, 1995.
- SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoectes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 1527 -1532, 1991.
- SHEKELLE, R.B.; LIU, S.; RAYNOR, W.J.; LEPPER, M.; MALIZA, C.; ROSSOF, A.; PAUL, O.; MACMILLAN-SHYROCK, A.; STAMLER, J. Dietary vitamin A and risk of cancer in the western electric study. **Lancet**. v. 2, p. 1185–1190, 1981.
- SHEKUNOV, B. Y.; CHATTOPADHYAY, P.; SEITZINGER, J.; HUFF, R. Nanoparticles of poorly water-soluble drugs prepared by supercritical fluid extraction of emulsions, **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 196–204, 2006.
- SHI, J.; MAGUER, M.L.; KAKUDA, Y.; LIPTAY, A.; NIEKAMP, F. Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. **Food Research International**, v. 32, p. 15-21, 1999.
- SHIMIDZU, N., GOTO, M., MIKI, W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. **Fisheries Science**. v. 62, n. 1, p. 134-137, 1996.
- SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos**. Campinas, 2004. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2004.
- SIMPSON, K. L. CHICHESTER, C. O. Metabolim and nutritional significance of carotenoids. **Annu Review Nutrition**, v. 1, p. 351 – 374, 1981.
- SIMPSON, B. K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V. ASHIE, I. N. A. Enzymatic Hidrolysis of Shrimp meat. **Food Chemistry**, v. 6, n. 1/2, p. 131 -138, 1998.
- SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 7, p. 212–222, 1985.
- SOUTHON, S. Increased fruit and vegetable consumption within the EU: Potential health benefits. **Food Research International**. v. 33, p. 211-217, 2000.

SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 37, p. 397-408, 2006.

SUN, T.; XU, Z.; GODBER, S. Ultrasound assisted extraction in quantifying lutein from chicken liver using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 830, n. 1, p. 158-160, 2006.

SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**. v.49, n. 3, p. 409-414, 1994.

SYLVIA, G., MORRISSEY, M. T., GRAHAM, T., GARCÍA, S. Organoleptic qualities of farmed and wild salmon. **Journal of Aquatic Food Products Technology**. v. 4, p. 51-64, 1995.

TATSCH, P. O. **Produção de carotenóides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator**. Erechim, 2008. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada (URI), 2008.

TROSKO, J.E. Mechanism of up-regulated gap junctional intercellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. **Mutation Research**. v. 480-481, p. 219-229, 2001.

TURTON, R.; BAILIE, R. C.; WHITING, W. B.; SHAEIWITZ, J. A. **Analysis, synthesis, and design of chemical process**. PTR Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; DAOOD, H. G.; DEÁK, A.; SAWINSKY, J. Recovery of pigments from *Origanum majorana* L. by extraction with supercritical carbon dioxide. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 50, p. 2297–2301, 2002.

VALDUGA, E. **Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636**. Tese de Doutorado em Engenharia Química – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2005.

VARONA, S.; KARETH, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Formulation of lavender essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 369-377, 2010.

VASAPOLLO, G.; LONGO, L.; RESCIO, L.; CIURLIA, L. Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 29, p. 87–96, 2004.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, p. 303-313, 2001.

WANG, Y.; XU-XIAO, Y., LIESHOUT, M.V., WEST, C., LUGTENBURG, J., VERHOEVEN, M.A., CREEMERS, A.F.L.; VAN-BREEMEN, M. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of bioavailability and bioconversion of betacarotene to retinol in humans. **Analytical Chemistry**. v. 72, p. 4999–5003, 2000.

WATHENE, E.; BJERKENG, B.; STOREBAKKEN, T.; VIDAR, V.; ODLAND, A. B. Pigmentation of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. **Aquaculture**, v. 159, p. 217-231, 1998.

WELLER, P., BREITHAUPT, D.E. Identification and quantification of zeaxanthin esters in plants using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 51, p. 7044–7049, 2003.

WIKIPEDIA – A enciclopédia livre. Disponível em: <http://wikipedia.org.br>. Acesso em: 05.fev.2009.

YOUNG, A.J.; LOWE, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives on Biochemistry and Biophysics**. v. 385, p. 20-27, 2001.

ZIEGLER, R.G. A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. **Journal of Nutrition**. v. 119, p. 116-122, 1989.

CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho consistiu do resíduo de processamento de camarão rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*), composta essencialmente pela cabeça, carapaça e cauda do animal. O resíduo foi cedido pela *Peixaria Nelson Santos* (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil), situada no mercado público municipal. O resíduo proveniente do processamento de camarão foi coletado em uma única amostragem, no mês de maio de 2009, representativa ao período de máxima produção. A matéria-prima foi armazenada em sacos plásticos, em freezer (Freezer 220, C&S, Brasil) até a realização dos procedimentos de pré-tratamento da matéria-prima.

3.2 Pré-tratamento da matéria-prima

O resíduo de camarão rosa foi submetido aos seguintes procedimentos no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) da UFSC: (a) nenhum tratamento (amostra *in natura*), (b) moagem; (c) secagem e moagem; (d) tratamento térmico; (e) tratamento térmico e moagem; (f) tratamento térmico, secagem e moagem, de acordo com os procedimentos descritos a seguir. As amostras de resíduo de camarão referente aos pré-tratamentos (d), (e) e (f) foram submetidas a um rápido tratamento térmico em banho-maria na temperatura de 373,15 K durante 10 min, de acordo com Perdigão et al. (1995). As amostras de resíduo de camarão referentes aos pré-tratamentos (c), e (f) foram submetidas à secagem na temperatura de 333,15 K durante 5 h em estufa com circulação de ar (DL-SE, DeLeo, Brasil), de acordo com os melhores resultados apresentados por Perdigão et al. (1995). Por fim, as amostras de resíduo de camarão referentes aos pré-tratamentos (b), (c), (e) e (f) foram submetidas à moagem em moedor doméstico (LiqFaz, Wallita, Brasil), usando massa constante de amostra de 100 g e tempo de moagem de 15 s.

A eficiência das diferentes metodologias de pré-tratamento foi avaliada de acordo com a liberação dos compostos carotenóides para a extração utilizando o método clássico de extração de carotenóides. Este método é descrito por Chen e Meyers (1982) e foi executado em triplicada para cada amostra. A extração consiste em acondicionar 5 g de matéria-prima *in natura* ou pré-tratada em um balão de fundo chato e adicionar 200 mL de uma mistura de solventes (éter de petróleo:

acetona: água, 15:75:10, v/v/v). A mistura permaneceu em contato durante 24 h a 278,15 K, em refrigerador doméstico (Freezer 280, Brastemp, Brasil), com proteção de luz. A separação da amostra e extrato foi realizada através de filtração por gravidade à temperatura ambiente. Os extratos brutos obtidos foram mantidos em refrigerador doméstico (Freezer 280, Brastemp, Brasil) a 275,15 K até ser realizado o processo de eliminação dos solventes, o qual foi realizado em rota-evaporador com redução de pressão (550, Fisatom, Brasil). Os resultados foram expressos como rendimento de extração em % m/m, em base seca (b.s.). Ainda, os pré-tratamentos foram avaliados através do teor total de carotenóides, determinado de acordo com a metodologia apresentada na seção 3.6.1.

3.3 Caracterização da matéria-prima

A amostra obtida pelo pré-tratamento definido como mais adequado para liberação dos carotenóides para extração (resultados apresentados na seção 5.3.1) foi utilizada para o estudo de técnicas de extração a baixa e alta pressão. A matéria-prima pré-tratada foi caracterizada a partir dos seguintes aspectos físico-químicos: nitrogênio total, umidade e resíduo mineral fixo.

A determinação de nitrogênio total foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, através da determinação do teor de nitrogênio total pelo método Kjeldahl (método número 991.20 - AOAC, 1990), constituído de 3 etapas. Primeiramente a amostra passou por um processo de digestão para a conversão dos compostos orgânicos, posteriormente a amônia foi separada por destilação e recolhida por uma solução receptora. Por fim foi realizada a titulação para a determinação quantitativa da amônia. A determinação foi realizada em triplicata e os resultados expressos em base seca (b.s) como média \pm desvio padrão.

O método 925.09 da A.O.A.C. (1990) de determinação do teor de umidade e substâncias voláteis foi realizado no LATESC e fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis a 378,15 K. Cápsulas de alumínio foram previamente aquecidas em estufa (E.L. 003, Odontobrás, Brasil) a 378,15 K por 60 min, resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e mensuradas suas massas. A massa de resíduo de camarão (5 g) foi colocada nas cápsulas de alumínio, aquecida em estufa a 378,15 K durante 180 min, esfriada em dessecador até temperatura ambiente e pesada. Repetiram-se estas operações de aquecimento e resfriamento da amostra em intervalos de meia hora, até peso constante. O cálculo da umidade da amostra foi realizado através da equação (3.1):

$$\text{Teor de umidade e voláteis (\%)} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} * 100\% \quad (3.1)$$

onde: m_i = massa inicial de amostra (g); m_f = massa final de amostra (g).

A determinação da umidade da amostra de resíduo de camarão foi realizada em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão.

A determinação do resíduo mineral fixo foi realizada no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFSC, em mufla (Q.318.24, Quimis) a 723,15 K durante 360 min, segundo o método 923.03 da A.O.A.C. (1990). A determinação foi realizada em triplicata e os resultados expressos em b.s. como média \pm desvio padrão.

3.4 Técnicas de extração a baixa pressão do resíduo de camarão

Diferentes técnicas de extração a baixa pressão foram aplicadas no resíduo de camarão pré-tratado (pré-tratamento selecionado de acordo com os resultados apresentados na seção 5.3.1) e avaliadas em termos de rendimento de extração e características dos extratos (metodologias apresentadas na seção 3.6).

3.4.1 Extração Soxhlet (SOX)

O sistema Soxhlet consiste de um extrator que é acoplado na extremidade inferior a um balão de 250 mL e na extremidade superior a um condensador. De acordo com a metodologia proposta por Campos et al. (2008), 5 g de amostra foram envolvidos em um cartucho de papel filtro o qual foi inserido no extrator. O procedimento foi realizado no LATESC e foram utilizados 150 mL do solvente selecionado, o qual foi acondicionado no balão e aquecido através de uma manta de aquecimento na temperatura de ebulição deste. Com a evaporação do solvente, este entra no condensador e volta à forma líquida, entrando em contato com a amostra e ocorrendo a extração dos compostos solúveis. Quando a mistura soluto/solvente preenche o sifão, este é esvaziado, retornando ao balão onde é novamente aquecido e o processo de refluxo é repetido até o final das 8 h de extração.

As extrações Soxhlet foram realizadas com os seguintes solventes (P.A., Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA., Brasil): *n*-hexano (Hx); etanol (EtOH); acetona (Ac); isopropanol (IPA) e isopropanol:hexano (50:50, v/v) (Hx:IPA). Todos os solventes empregados são autorizados como solventes GRAS (General Recognized as Safe) e são utilizados nas indústrias de alimentos (FOOD AND DRUG REGULATION, 2005).

As extrações foram realizadas em triplicata e os extratos brutos obtidos foram mantidos em refrigerador doméstico (Freezer 280, Brastemp) a 275,15 K até o processo de eliminação do solvente.

3.4.2 Maceração (MAC)

O método de maceração consiste em uma extração a frio do resíduo de camarão pré-tratado, utilizando solvente orgânico. O procedimento foi realizado de acordo com Sachindra et al. (2006) no LATESC, pelo qual foram acondicionadas 25 g de matéria-prima pré-tratada em um balão de fundo chato e adicionados 100 mL de solvente. A mistura de matéria-prima e solvente foi mantida ao abrigo da luz por um período de 5 d na temperatura ambiente e com agitação manual uma vez ao dia. Cada extração foi realizada em triplicada usando os solventes Hx, EtOH, Ac, IPA, e a mistura binária de Hx:IPA (50:50, v/v). A separação da solução de extrato da matriz sólida foi realizada através de filtração por gravidade à temperatura ambiente. Os extratos brutos obtidos foram mantidos em refrigerador doméstico (Freezer 280, Brastemp) a 275,15 K até ser realizado o processo de eliminação dos solventes.

3.4.3 Ultrassom (UE)

A extração ultrassônica (UE) foi realizada em triplicada e adaptada de Gu et al. (2008) no LATESC. O método consistiu de adicionar 5 g de matéria-prima pré-tratada a 150 mL de EtOH, mantendo a solução sob ondas ultrassônicas (UltraCleaner 700, 55 kHz, 40 VA, Unique) durante 10 min. A solução de extrato foi separada da matriz através do uso de centrifuga (Q222T, Quimis) a 2000 g durante 20 min. Os extratos obtidos foram mantidos em refrigerador doméstico (Freezer 280, Brastemp) a 275,15 K até ser realizado o processo de eliminação dos solventes.

3.4.4 Extração com óleo vegetal a frio e a quente (OilC e OilH):

As extrações utilizando óleo vegetal como solvente foram classificadas de acordo com o tipo de óleo utilizado e a temperatura deste durante a extração. As extrações a frio (OilC) e a quente (OilH) foram conduzidas de acordo com o procedimento apresentado por Sachindra and Mahendrakar (2005) no LATESC, utilizando óleos comerciais de soja e de girassol (Liza, Cargill Inc.) como solventes, e realizadas em triplicata. O método de extração consistiu em misturar 10 g de matéria-prima pré-tratada com 40 mL de óleo vegetal em um balão de fundo redondo de 250 mL, protegido da luz. A mistura foi submetida a 2 h de agitação a temperatura ambiente, no caso da extração a frio, ou com aquecimento a 343,15 K, no caso da extração a quente. A

seguir, os extratos oleosos foram separados da matriz sólida utilizando filtração com celulose. O produto final, diferentemente dos produtos obtidos nos demais métodos a baixa pressão (SOX, MAC e UE) é um produto oleoso enriquecido de carotenóides. Assim, o rendimento das técnicas de extração com óleo vegetal a quente e a frio foi quantificada pelo conteúdo total de carotenóides extraído (obtido de acordo com metodologia apresentada na seção 3.6.1) e se referem especificamente ao rendimento em extração de carotenóides.

3.4.5 Tratamento dos extratos e eliminação dos solventes

Os extratos obtidos através de SOX, MAC e UE foram evaporados em rota-evaporador (mod. 802, Fisatom) no LATESC, sob vácuo de -650 mmHg e rotação de 60 rpm. As massas de extrato seco foram medidas em balança com precisão de 0,0001 (AS200S, OHAUS), o rendimento calculado em termos de massa de matéria-prima utilizada e os resultados expressos em b.s. como média \pm desvio padrão. Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em freezer doméstico (Freezer 260, Brastemp) a 255,15 K até a realização das análises de caracterização (metodologias apresentadas na seção 3.6).

3.5 Extração supercrítica do resíduo de camarão

A extração supercrítica do resíduo de camarão rosa foi realizada em uma unidade dinâmica de extração do LATESC. O extrator supercrítico utilizado opera a uma pressão máxima de 300 bar e vazões de solvente de 1,67 a 40,00 g/min. A unidade está apresentada na Figura 3.1 e foi completamente desenvolvida e construída pelo Laboratório *Thermische Verfahrenstechnik* da *Technische Universität Hamburg-Harburg* (TUHH), na Alemanha. O equipamento, conforme esquema apresentado na Figura 3.2, constitui-se de um cilindro de CO₂ com 99,9 % de pureza (White Martins), equipado com um tubo pescador que alimenta diretamente a linha de extração. O CO₂ segue para um banho termostático (BT1) (C10-K10, Thermo Haake) com temperatura programada para 274,15 K. A solução de etilenoglicol proveniente do banho termostático (BT1) circula em uma mangueira que envolve a bomba (1) (M111, Maximator) garantindo que o CO₂ se mantenha no estado líquido. A bomba trabalha alimentada por ar comprimido filtrado mantido na pressão mínima de 5 bar. A válvula globo (V1) (Tescom Cat nº26-1761-24-161) é utilizada para regular a pressão de operação. O extrator (E) constitui-se de um cilindro de aço inox encamisado de 31,60 cm de comprimento, 2,012 cm de diâmetro, volume de 103,28 mL

e extremidades rosqueadas. A linha que liga a bomba ao extrator bem como a linha após o extrator é mantida submersa em um banho termostático (BT2) (MQBTZ99-20, Microquímica) programado para manter a temperatura constante em 338,15 K, de modo a evitar o congelamento da válvula micrométrica (V4). No início do processo de extração a válvula (V2) (Maximator Cat nº 3710.0104) é mantida fechada e após a pressurização do solvente esta é aberta para permitir a passagem do CO₂ para o extrator. A temperatura do extrator é mantida constante na temperatura de extração desejada através de um banho termostático (BT3) (DC30-B30, Thermo Haake). Na saída do extrator é conectada uma válvula micrométrica (V4) (Sitec Microvalve 710.3012) para coleta de amostra. A válvula (V3) (Sitec Shutoff valve 710.3010) também conectada na saída do extrator auxilia a (V4) na despressurização do solvente e o rotâmetro (2) (ABB Automation Products 10 A 61) permite o controle do fluxo de solvente. O soluto é coletado em frascos âmbar (3) conectados após a (V4).

Uma bomba de co-solvente foi conectada a linha de extração a fim de alimentar o sistema com modificador (mistura de solventes orgânicos ou óleo vegetal a alta pressão), usando vazões pré-estabelecidas, com a finalidade de misturar-se ao fluxo de CO₂ na entrada do extrator.



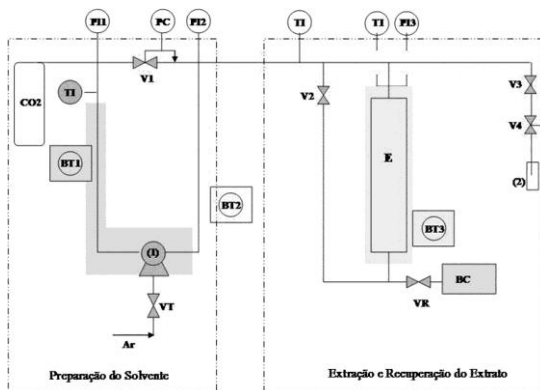
Figura 3.1 Foto do equipamento de ESC utilizado nos experimentos

O procedimento de extração é descrito por Michielin et al. (2005) e consiste no acondicionamento de uma massa fixa de 16 g de resíduo de camarão pré-tratado dentro da célula de extração, seguido da regulagem e controle das variáveis de processo (temperatura, pressão e vazão de solvente). A extração foi conduzida durante 180 min e o soluto coletado em frascos âmbar e medida a massa extraída em balança com precisão de 0,0001 (AS200S, OHAUS).

O experimentos de extração supercrítica foram divididos em 3 grupos: (a) Curvas de extração usando CO₂ puro, realizadas a 200 bar e 333,15 K, avaliando a aplicação de duas vazões fixas de CO₂ (8,3 e 13,3 g/min) e duas umidades da matéria-prima (11,21 e 46,30 %), com a finalidade de identificar os períodos cinéticos da extração e aplicar modelos matemáticos que descrevam o fenômeno (modelos descritos na seção 3.5.1); (b) Extração total utilizando CO₂ puro como solvente nas condições fixas de 313,15-333,15 K e 100-300 bar, na vazão constante de solvente de $13,3 \pm 0,8$ g/min; (c) Ensaios com co-solvente, nos quais a mistura de Hx:IPA (50:50, v/v) ou óleo de girassol (selecionados de acordo com os melhores resultados das técnicas a baixa pressão – seção 5.3.2) foi misturado ao CO₂ supercrítico nas concentrações fixas de 2 e 5 % (m/m), considerando os limites de operação da bomba e o objetivo de reduzir o volume de modificador utilizado. Este último grupo de experimentos foi realizado a 333,15 K e 300 bar e, no caso da solução de Hx:IPA, o extrato foi concentrado com redução de pressão em rota-evaporador (Fisatom, 802, Brasil). No caso do óleo vegetal, o rendimento de extração foi quantificado utilizando o conteúdo total de carotenóides (obtido de acordo com procedimento descrito na seção 3.6.1) e se refere especificamente ao rendimento de extração em carotenóides. Para os demais experimentos de ESC, o rendimento de extração foi determinado pela razão mássica entre o extrato obtido e a matéria-prima utilizada.

3.5.1 Modelagem matemática das curvas de extração supercrítica

As curvas de extração supercrítica do resíduo de camarão (experimentos do grupo (a) indicados na sessão 3.5) foram obtidas através de plotagem da massa de extrato extraída em função do tempo de extração, a fim de descrever as diferentes etapas de extração: etapa constante de extração (CER), etapa de extração decrescente (FER) e etapa difusional. Para a análise cinética do procedimento de extração, a modelagem das curvas foi realizada usando os seguintes modelos matemáticos: modelo de Sovová (1994), modelo logístico de Martínez et al. (2003) e o modelo de placas (SSP) de Gaspar et al. (2003). O software Mass Transfer (LATESC/UFSC), desenvolvido em Delphi 7.0 e o qual utiliza o método da máxima verossimilhança para minimizar a soma dos quadrados dos desvios calculados (KITZBERGER et al., 2009), foi utilizado para a aplicação dos modelos de Martínez et al. (2003) e de Gaspar et al. (2003). O modelo de Sovová (1994) foi aplicado de acordo com o método de otimização sem derivação (POWELL, 2009), usando uma rotina do software Fortran.



E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas da entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; PI1: Manômetro de controle do cilindro (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10); PI2: Manômetro de controle da bomba (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10); PI3: Manômetro de controle do extrator (WIKA do Brasil, PI:Cat 233.50.10); TI: Controladores de temperatura

Figura 3.2 Diagrama esquemático do equipamento de ESC utilizado nos experimentos

Os modelos aplicados requerem informações adicionais, como: (a) diâmetro de partícula (d_p) da matéria-prima, que foi determinada utilizando microscópio eletrônico de varredura (JSM-63990LV, JEOL) do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC; (b) massa específica do sólido (ρ_s), determinada em picnômetro de gás He (AccuPyc II 1340, Micrometrics), no LATESC; (c) diâmetro e altura do leito de extração, medidas utilizando paquímetro; (d) Massa específica do leito de extração (ρ_a), calculada pela razão entre a massa e volume de matéria-prima utilizada para montar o leito de extração; (e) massa específica do solvente (ρ_{CO_2}), determinada de através da equação de Angus et al. (1976); (f) porosidade do leito (ϵ), determinada pela razão $(\rho_s - \rho_a)/\rho_s$. Além disso, o modelo de Sovová (1994) considera a solubilidade do extrato no CO_2 supercrítico (Y^*) em função da temperatura e pressão aplicadas. De acordo com estudos prévios realizados no LATESC, a solubilidade exerce pequena influência no ajuste do modelo de Sovová e, para a sua determinação, é necessário um estudo complexo do equilíbrio de fases do sistema avaliado. Assim, para o presente trabalho, a solubilidade do extrato de camarão em CO_2 foi obtida de acordo com o procedimento simplificado descrito por Danielski et al. (2007), chamando-a de solubilidade preliminar do

sistema. Assim, a solubilidade preliminar foi obtida na unidade de extração supercrítica descrita na seção 3.5 pelo método dinâmico de extração, onde a solubilidade é representada pela inclinação das curvas de extração, na etapa de taxa constante de extração (CER), garantindo-se tempo de contato entre as fases suficiente para que o equilíbrio seja alcançado. A vazão utilizada para determinação da solubilidade preliminar foi baseada no estudo feito por Danielski et al. (2007), que definiu a faixa de 0,9 a 1,4 g/min para a solubilidade de oleoresinas em CO₂ supercrítico. Assim, a vazão utilizada no presente estudo foi de aproximadamente 0,9 g/min, o tempo de extração foi de aproximadamente 600 min e as curvas construídas através da massa de soluto acumulado *versus* massa de CO₂ consumido.

3.5.2 Validação do coeficiente de transferência de massa convectivo modelado através de correlações adimensionais

Os modelos matemáticos que representam fenômenos de transferência de massa contêm dois tipos de incertezas: a) Incerteza do modelo, devido a uma descrição físico-matemática não exata do sistema através de simplificações excessivas; b) Incertezas dos parâmetros, resultantes de erros nos dados experimentais utilizados para estimar os parâmetros modelados (FIORI et al., 2007). Portanto, considerando a imprecisão dos parâmetros, foi realizada uma análise comparativa para o parâmetro mais importante em termos de significado físico, o coeficiente de transferência de massa convectivo na fase de solvente ($k_Y a$). Os valores experimentais deste parâmetro foram determinados a partir da modelagem de Sovová (1994) das diferentes curvas de extração supercrítica obtidas neste trabalho e foram utilizados no cálculo do número adimensional de Sherwood (Sh), nomeado como Sh experimental. Assim, os valores de Sh experimental (Sh_e) foram calculados de acordo com a equação (3.2) (WELTY et al., 1983):

$$Sh_e = \frac{k_Y a (d_p)^2}{6D_{AB}} \quad (3.2)$$

onde: $k_Y a$ é o coeficiente de transferência de massa na fase solvente, obtido através do ajuste das curvas experimentais com o modelo de Sovová (1994) (resultados apresentados na seção 6.3.1); d_p é o diâmetro de partícula da matéria-prima, determinado por microscopia eletrônica de varredura; D_{AB} é o coeficiente binário de difusão e foi calculado de acordo com a correlação de Reddy e Doraiswamy (REID et al., 1986), a qual considera difusão mútua do soluto A (principais compostos presentes no extrato do resíduo de camarão: astaxantina e ácidos graxos

ω -3) em concentrações mínimas no solvente B (CO₂).

Os valores de Sh_e foram comparados com Sh obtido através de correlações empíricas. Essas correlações normalmente envolvem os números adimensionais Reynolds (Re) e Schmidt (Sc), os quais podem ser calculados de acordo com as equações (3.3) e (3.4), respectivamente (WELTY et al., 1983):

$$Re = \frac{d_p v \rho_{CO_2}}{\mu_{CO_2}} \quad (3.3)$$

$$Sc = \frac{\mu_{CO_2}}{\rho_{CO_2} D_{AB}} \quad (3.4)$$

onde: d_p é o diâmetro de partícula da matéria-prima, determinado por microscopia eletrônica de varredura; a velocidade intersticial do solvente (v) foi obtida a partir da vazão de solvente; os valores de viscosidade do solvente (μ_{CO_2}) foram determinado de acordo com o método de Reichemberg (REID et al., 1986), o qual usa a abordagem da teoria cinética e equações interpolativas de rendimento entre a as viscosidades dos componentes puros; a massa específica do solvente (ρ_{CO_2}) foi calculada para cada condição operacional de acordo com a correlação de Angus et al. (1976). Devido a fração molar do soluto, extrato do resíduo de camarão, no solvente supercrítico ser baixa, a massa específica e a viscosidade do solvente puro puderam ser empregadas na estimativa de Re, Sc e Sh.

Três correlações de Sh bem estabelecidas foram utilizadas para o cálculo dos números de Sherwood: a correlação de Wakao e Kagui (1982), apresentada na equação (3.5), considera que no processo estão envolvidas a convecção forçada e natural e se aplica para $3 < Re < 3000$ e $0,5 < Sc < 10000$; a correlação de Tan et al. (1988), ilustrada na equação (3.6), não considera a convecção natural e foi desenvolvida para $2 < Re < 40$; e a correlação de King et al. (1983), mostrada na equação (3.7), também considera apenas convecção forçada e é válida para $2 < Re < 0$ and $2 < Sc < 11$.

$$Sh = 2 + 1,1Re^{0,6}Sc^{1/3} \quad (3.5)$$

$$Sh = 0,38Re^{0,6}Sc^{1/3} \quad (3.6)$$

$$Sh = 0,82Re^{2/3}Sc^{1/3} \quad (3.7)$$

3.5.3 Estimativa de custos da extração supercrítica em escala industrial

A metodologia de Turton et al. (1998), apresentada por Rosa e Meireles (2005), foi usada para estimar o custo da manufatura (COM), o qual é influenciado por uma série de fatores que podem subdivididos em três categorias: custos diretos, custos fixos e despesas gerais. Os custos diretos levam em conta despesas que dependem diretamente da taxa de produção, como matérias-primas, utilitários e operadores. Os custos fixos não dependem se a operação é interrompida, e incluem a depreciação, taxas e seguros, etc. As despesas gerais relacionam os custos necessários para manter o negócio e consistem em custos administrativos, despesas com vendas, pesquisa e desenvolvimento, entre outros. Assim, o COM pode ser calculado usando a equação (3.8):

$$COM = 0,304FI + 2,73COL + 1,23*(CRM + CWT + CUT) \quad (3.8)$$

onde: COM = custo de manufatura correspondente a um ano de operação; FI = fração de investimento, representado pelo custo do equipamento; CRM = custo das matérias-primas, composto pelo custo de do CO₂, da matéria-prima sólida e do transporte; COL = custo de operadores; CUT = custo de utilitários, formado pelo custo energético para a destilação *flash*, condensação, bomba e operações de troca de calor; e CWT = custo de tratamento de efluentes.

Os valores de custo de manufatura e custo específico foram determinados usando o software Tecanalysis (ROSA e MEIRELES, 2005), considerando: duas unidades comerciais com distintas capacidades volumétricas (3 x 300 L e 2 x 400 L); tempos de extração de 25 e 180 min, os quais representam o período de taxa constante de extração e o tempo total de extração, respectivamente; as condições operacionais do ensaio de extração supercrítica que apresentaram maior rendimento em astaxantina obtido na presente tese (resultados apresentados na seção 6.3.5), ou seja 300 bar e 333,15 K.

3.6 Caracterização química e biológica dos extratos

3.6.1 Perfil e conteúdo total de carotenóides

Os extratos obtidos pelas diferentes técnicas de extração foram adequadamente homogeneizados em *n*-hexano (2 mL) e as soluções resultantes foram centrifugadas a 3000 g durante 5 min. As soluções de extrato foram analisadas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Departamento de Ciência em Alimentos da UFSC, seguindo o procedimento descrito por Kuhnen et al. (2009) usando 5 µL de amostra

de extrato, em triplicata. O cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A) é equipado com uma coluna de fase reversa C₁₈ (Vydac - BioRad, 218TP54, 250 mm x 4,6 mm Ø, 5 µm) termostaticada (313,15 K) acoplada com uma coluna de guarda (Vydac - BioRad, 218TP54, 30 mm x 4,6 mm Ø, 5 µm), e um detector UV-visível ($\lambda = 460$ nm). A fase móvel utilizada foi uma mistura de acetonitrila:metanol (90:10, v/v - Tedia) na vazão de 0,8 mL/min. A identificação dos carotenóides foi realizada a partir dos tempos de retenção determinados através de co-cromatografia dos compostos padrões (Sigma Aldrich), sendo estes submetidos as mesmas condições de análise dos extratos de resíduo de camarão. A quantificação relativa dos compostos identificados foi baseada na integração das áreas dos picos cromatográficos de cada componente, utilizando as curvas padrões dos compostos puros ($y = 44231,57x$, $r^2 = 0,994$, para astaxantina livre, astaxantina esterificada e d β -criptoxantina; e $y = 1000000x$, $r^2 = 0,991$, para α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno).

Todos os extratos obtidos pelas tecnologias a baixa pressão (SOX, MAC, UE, OilC e OilH) e supercrítica (experimentos dos grupos (b) e (c) indicados na sessão 3.5) foram avaliados quanto ao seu perfil cromatográfico e os resultados foram expressados como: (1) concentração de cada carotenóide identificado; (2) conteúdo total de carotenóides (TCC), obtido pela soma das quantidades de todos os carotenóides identificados; (3) rendimento em astaxantina, calculado considerando o rendimento de extração e a concentração de astaxantina.

3.6.2 Espectro no UV-Visível

Os extratos de resíduo de camarão rosa (20 mg) foram transferidos para frascos âmbar, homogeneizados com 10 mL de *n*-hexano e, então, agitados manualmente. O perfil UV-Visível das amostras foi obtido através de um espectrofotômetro UV-Visível (U-1800, Hitachi) no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC, na janela espectral de 200 to 750 nm, e realizado em triplicata. Todos os extratos obtidos pelas tecnologias a baixa pressão (SOX, MAC, UE, OilC e OilH) e alta pressão (experimentos dos grupos (b) e (c) indicados na sessão 3.5) foram avaliados quanto ao seu perfil UV-Visível.

3.6.3 Espectroscopia no infravermelho

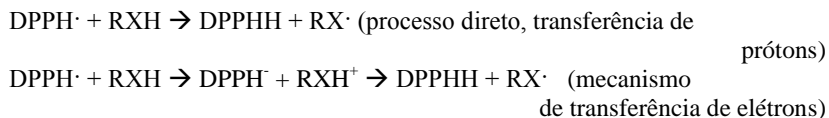
A análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada utilizando um espectroscópio Bomem (FTLA2000, Bomem Inc.) equipado com detector DTGS (sulfato de

triglicina deuterado), na Central de Análises da UFSC e de acordo com o método descrito por Silverstein (1979). As amostras de extrato (5 mg) foram misturadas com KBr previamente pulverizado e o pó comprimido em pastilhas. Os espectros (5 réplicas, 128 leituras co-adicionadas antes da transformação Fourier) foram registrados no modo transmitância de 3000 a 600 cm^{-1} . Os espectros de cada amostra foram normalizados e a linha de base corrigida na região de interesse. Assim, a resolução melhorada (fator k de 1,5) foi aplicada por meio da auto-deconvolução de Fourier, através do software Bomem Easy Program. As amostras obtidas por maceração com etanol e com acetona foram selecionadas para a avaliação de seu perfil infravermelho, devido as grandes diferenças entre seus perfis UV-Visível (resultados apresentados na sessão 5.3.2.4), a fim de obterem-se mais informações a respeito da composição de extrato do resíduo de camarão.

3.6.4 Capacidade antioxidante

3.6.4.1 Atividade do radical DPPH (DPPH)

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazina) é considerado um radical estável e tem sua absorção máxima em 517 nm. Quando este composto recebe um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar um composto mais estável, sua absorção diminui. Este processo pode ocorrer de duas maneiras: processo direto ou processo de transferência de elétron:



No processo direto o antioxidante (RXH) doa um radical hidrogênio para o radical DPPH \cdot tornando-o estável. O radical RX \cdot é relativamente estável e não reage com os lipídios. No processo de transferência de elétron, primeiramente um elétron é cedido para o radical DPPH \cdot pela molécula do antioxidante e, em seguida, é cedido o hidrogênio estabilizando o radical DPPH \cdot e formando o radical estável RX \cdot .

A metodologia, descrita por Mensor et al. (2001) e realizada no LATESC, constitui na reação por 30 min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, do composto em análise em uma solução etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,3 mmol/L e com concentrações crescentes (5, 50, 100, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dos extratos de resíduo de camarão, em etanol P.A. (Merck S.A., Brasil), com posterior leitura da absorbância em espectrofotômetro (8500II-UV/VIS, Techcomp Ltda.). Quanto maior a capacidade antioxidante da

amostra testada, mais estável o radical DPPH se torna, provocando a descoloração da solução (DPPH + extrato) e diminuindo a absorbância. Deste modo, o percentual de inibição das amostras testadas sobre o radical DPPH pode ser calculado convertendo-se a absorbância em percentual de capacidade antioxidante (%AA), conforme a equação (3.9):

$$\% AA = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (3.9)$$

onde: $Abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra após 30 min de reação; Abs_{branco} é a absorbância do branco após 30 min de reação; $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle após 30 min de reação.

A concentração das amostras necessária para captar 50 % do radical livre DPPH (EC_{50}) é calculada por análise de regressão exponencial e linear (MENSOR et al., 2001). Os valores de capacidade antioxidante calculados (%AA) são referentes à maior concentração de extrato testada (1000 $\mu\text{g/mL}$). Todos os extratos obtidos pelas tecnologias a baixa (SOX, MAC, UE, OilC e OilH) e alta pressão (experimentos dos grupos (b) e (c) indicados na sessão 3.5, com exceção dos experimentos a 100 bar devido aos baixos rendimentos de extração apresentados) foram avaliados pela técnica do DPPH sendo que os resultados encontrados de concentração efetiva (EC_{50}) e capacidade antioxidante (%AA) foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.6.4.2 Método da descoloração do β -caroteno

O método de determinação da capacidade antioxidante pela descoloração do sistema β -caroteno é fundamentado em medidas espectrofotométricas da perda de coloração (oxidação) do β -caroteno induzida por produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. A metodologia utilizada é descrita por Matthäus (2002), na qual o sistema formado por β -caroteno e ácido linoléico é induzido a uma rápida descoloração na ausência de um composto antioxidante. O radical livre é formado pelo ácido linoléico e por um átomo de hidrogênio retirado de um dos grupos metila da molécula de β -caroteno. A taxa de descoloração da solução de β -caroteno é determinada pela medida entre a diferença da leitura espectrofotométrica inicial a 470 nm e após 120 min.

A metodologia, realizada no LATESC, consiste inicialmente na preparação de duas emulsões, uma com adição de β -caroteno e outra sem (branco). Para o preparo da emulsão de β -caroteno, foi transferido

para um balão de 250 mL, 40 mg de ácido linoléico (Vetec Química Fina Ltda.), 400 mg de Tween-20 (Vetec Química Fina Ltda.) e 3,4 mg de β -caroteno (Fluka Analytical). A este balão adicionou-se 1 mL de clorofórmio (Merck S.A.) e agitou-se até a completa solubilização das partículas de β -caroteno. O clorofórmio foi então removido em evaporador rotativo (Mod. 550 e 802, Fisatom) com arrefecimento (MQBTZ99-20, Microquímica Ind. Com. e Repr. Ltda.) e controle de vácuo (NT 613, Nova Técnica) a 313,15 K e, à mistura, foram adicionados 100 mL de água destilada, sendo manualmente agitada para formar uma solução estável. A emulsão de branco foi preparada com 40 mg de ácido linoléico, 400 mg de Tween-20 e 100 mL de água destilada, sendo também agitada manualmente. As duas emulsões foram mantidas refrigeradas e ao abrigo da luz até a realização das análises.

Uma alíquota de 5 mL da solução de β -caroteno foi adicionada à 200 μ L do extrato, sendo que cada um dos extratos a ser testado foi diluído em etanol P.A. (Merck S.A.) na concentração final de 1667 μ g/mL. Imediatamente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (8500II-UV/VIS, Techcomp Ltda.) em comprimento de onda de 470 nm com respectivas soluções de branco, constituídas de 5 mL emulsão de branco e 200 μ L do extrato. Os tubos foram imediatamente imersos em banho termostatizado (Biomatic Aparelhos Científicos Ltda.) a 323,15 K durante 2 h de reação, realizando-se leituras nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Em paralelo, foi realizado também o controle do teste, onde a amostra foi substituída por etanol. Os resultados de capacidade antioxidante (AA %) foram calculados pela equação (3.10) e expressos como média \pm desvio padrão.

$$\% AA = 1 - \left\{ \frac{(Abs_{120min} - Abs_{0min})}{(Abs_{controle_{120min}} - Abs_{controle_{0min}})} * 100 \right\} \quad (3.10)$$

onde: Abs_{120min} é a absorbância da amostra após 120 min de reação;
 Abs_{0min} é a absorbância da amostra no instante inicial de reação;
 $Abs_{controle_{120min}}$ é absorbância do controle após 120 min de reação;
 $Abs_{controle_{0min}}$ é absorbância do controle no instante inicial de reação.

Todos os extratos obtidos pelas tecnologias a baixa (SOX, MAC, UE, OilC e OilH) e alta pressão (experimentos dos grupos (b) e (c) indicados na sessão 3.5, com exceção dos experimentos a 100 bar devido aos baixos rendimentos de extração apresentados) foram avaliados pela técnica de descoloração do β -caroteno sendo que os resultados de capacidade antioxidante (%AA) encontrados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.6.5 Conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC)

A determinação do conteúdo total de compostos fenólicos, representado pela capacidade redutora dos extratos, foi realizada no LATESC através do método de Folin-Ciocalteu descrito por Peschel et al. (2005). O método de Folin-Ciocalteu está associado ao aparecimento da coloração azul devido à oxidação de compostos contendo anéis fenólicos em meio básico (PESCHEL et al., 2005). A vantagem deste método é que o resultado está associado ao aparecimento de cor no comprimento de onda avaliado, sendo que procedimentos associados com o aparecimento de produtos coloridos são mais sensíveis. Embora não deva caracterizar a capacidade antioxidante, este método é um dos melhores para uma estimativa da capacidade antioxidante de amostras de alimentos.

O método de Folin-Ciocalteu é o método mais antigo para a determinação do conteúdo total de fenólicos, então chamados fenóis totais ou capacidade redutora. O sistema de teste é uma mistura de tungstato e molibdato em meio altamente básico. Os compostos fenólicos são oxidados em meio básico resultando na formação do radical superóxido O_2^- , o qual por sua vez, reage com molibdato formando óxido de molibdênio, MoO_4^+ , que possui uma absorbância muito intensa próximo a 750 nm.

Para a construção da curva padrão de ácido gálico foi preparada uma solução estoque de 0,005 g/mL de ácido gálico (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) em água destilada. Esta solução foi diluída em balões volumétricos de 100 mL para a obtenção de soluções com concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg ácido gálico/L de água destilada. A reação de oxidação foi realizada em balões volumétricos de 10 mL sendo transferindo para estes 100 μ L de cada diluição, aos quais foram adicionados 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu (Fluka). Após 30 s do início da reação e antes de completar 8 min foi adicionado 1,5 mL de solução aquosa de carbonato sódico (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) a 20 % (m/v). Os balões foram agitados e o volume diluído a 10 mL de solução com água destilada. As soluções foram deixadas em repouso ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 2 h. A absorbância de cada solução foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (SP1100, Tecnal, Piracicaba/SP) e o branco realizado com água destilada. A curva padrão de ácido gálico foi construída através do gráfico de absorbância *versus* concentração de ácido gálico (μ g/mL).

Cada extrato de resíduo de camarão avaliado foi diluído em etanol P.A. (Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) na concentração final de 1500 µg/mL e seguiu o mesmo procedimento de reação de oxidação descrita para a curva padrão. Os valores de absorvância obtidos para os extratos de resíduo de camarão foram correlacionados com a curva padrão de ácido gálico e o teor de fenólicos totais (TPC) determinado através da equação (3.11), a análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mgGAE/g de extrato, como média ± desvio padrão.

$$TPC(mgGAE / g_{ext}) = \left\{ \frac{[EqAG * 1000]}{D_{ext}} \right\} \quad (3.11)$$

onde: EqAG representa o equivalente em ácido gálico obtido através da curva padrão (mgGAE/L); D_{ext} é a diluição das amostras (mg_{ext}/L).

Os extratos de resíduo de camarão obtidos pelos sistemas SOX-EtOH e extração supercrítica a 333,15 K/300 bar, usando CO₂ puro, foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu com a finalidade de associar a composição em fenólicos com os resultados dos ensaios anti-obesidade e hipolipemiante (detalhada na sessão 3.6.7), os quais avaliaram *in vivo* essas amostras.

3.6.6 Composição em ácidos graxos

O perfil em ácidos graxos foi determinado pelo Laboratório de Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo (UPF), segundo o método Ce 1f-96 (AOCS, 2002) que se baseia no princípio de que os ácidos graxos são esterificados por uma solução de NH₄Cl - H₂SO₄ - MeOH. Os ácidos graxos livres dos extratos de resíduo de camarão foram extraídos com uma solução 0,5 N de NaOH-Metanol, seguida de purificação com NaCl e hexano para remoção de contaminantes como açúcares, sais e proteínas. O sobrenadante foi injetado em um cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (3400 CX, Varian) e coluna capilar CP Sil 88 (0,20 µm, 50 m x 0,25 mm). O gás de arraste empregado foi o hidrogênio ultra puro (White Martins) a 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 413,15 K, com gradiente de 1 K/min até a temperatura final de 458,15 K, com temperatura de detecção de 458,15 K. A quantidade de amostra injetada foi 1 µL. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões, quantificados por normalização de áreas, através de software Work Station, sendo as determinações realizadas em duplicata e os resultados apresentados como média ± desvio padrão.

Os extratos de resíduo de camarão obtidos pelos sistemas SOX-EtOH e extração supercrítica a 333,15 K/300 bar (usando CO₂ puro) foram analisados por cromatografia gasosa com a finalidade de associar a composição em ácidos graxos com os resultados dos ensaios anti-obesidade e hipolipemiante (detalhada na sessão 3.6.7), os quais avaliaram *in vivo* essas amostras.

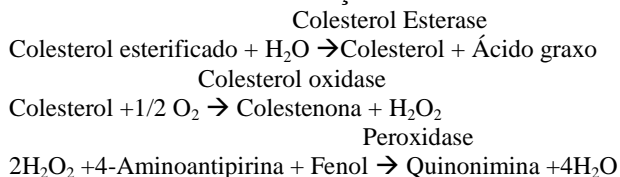
3.6.7 Atividades anti-obesidade e hipolipemiante

A fim de avaliar o efeito redutor de peso corporal e dos teores de colesterol e triglicerídeos sanguíneos dos extratos de resíduo de camarão, uma análise *in vivo* foi realizada no Laboratório de Bioquímica Experimental do Departamento de Bioquímica da UFSC (LABIOEX). A análise foi realizada utilizando 36 camundongos do tipo *knocaut* (sem receptor LDL), divididos entre machos e fêmeas, pesando 21 ± 4 g, provenientes do Biotério Central da UFSC. Os ratos foram alojados em condições controladas de luz (12 h de ciclo claro-escuro), temperatura de $295,15 \pm 2$ K, e umidade relativa do ar de 60 %. Os animais foram autorizados a se aclimatar por no mínimo 7 dias antes do tratamento e foram manipulados de acordo com as exigências legais cabíveis a espécie (Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals, publicação #85.23, revisada em 1985) e com permissão do comitê de ética local de uso de animais (PP00604/2011.0337 do Comitê de Ética ao Uso de Animais da UFSC).

Os animais foram divididos em 6 grupos de acordo com seus pesos corporais, sendo cada grupo composto por 6 camundongos: a) grupo sem tratamento (controle negativo), o qual recebeu somente ração regular *ad libitum* e água (sem adição de extrato do resíduo de camarão nem dieta hipercalórica); b) grupo hipercalórico (controle positivo), alimentado com dieta hipercalórica e água (sem administração de extrato de resíduo de camarão); c) grupo SOX 50, o qual foi tratado com dieta hipercalórica, água e extrato de resíduo de camarão obtido pelo sistema Soxhlet-etanol na concentração de 50 mg/kg_{camundongo} por dia; d) grupo SOX 200, para o qual foram administrados a dieta hipercalórica, água e extrato de resíduo de camarão obtido pelo sistema Soxhlet-etanol na concentração de 200 mg/kg_{camundongo} por dia; e) grupo ESC 50, para o qual forneceu-se dieta hipercalórica, água e extrato supercrítico de resíduo de camarão obtido a 300 bar/333,15 K na concentração de 50 mg/kg_{rat} por dia; e f) grupo ESC 200, o qual foi tratado com dieta hipercalórica, água e extrato supercrítico de resíduo de camarão obtido a 300 bar/333,15 K na concentração de 200 mg/kg_{rat} por dia. A dieta hipercalórica foi definida por Rothwell et al. (1982) como “dieta de

cafeteria” e é composta por alimentos como biscoitos de chocolate e de leite, batata-frita, queijo, amendoim, entre outros (Quadro 3.1). As amostras de extrato do resíduo de camarão obtidas pelos sistemas SOX-EtOH e extração supercrítica a 333,15 K/300 bar (usando CO₂ puro) foram selecionadas para a realização dos ensaios anti-obesidade e hipolipemiante devido aos seus elevados rendimentos de extração e conteúdos totais de carotenóides (resultados apresentados na sessão 5.3.2). As soluções de extrato foram preparadas em água destilada e foram administradas por gavagem. O peso dos animais foi monitorado 3 vezes por semana durante todo o período de tratamento (30 d). Trinta dias após o início do tratamento, amostras de sangue dos animais foram coletadas e os conteúdos de colesterol e triglicerídeos foram mensurados utilizando métodos enzimáticos (ABELL et al. 1952; BUCOLO e DAVID, 1973) através de kits Biotécnica®

O princípio do método enzimático de determinação de colesterol total está em que os ésteres de colesterol existentes na amostra são hidrolisados pela enzima colesterol esterase produzindo o colesterol livre. A enzima colesterol oxidase, em presença de oxigênio, catalisa a oxidação do colesterol livre, produzindo o peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do reagente fenólico (fenol) pelo peróxido de hidrogênio formado, em presença de aminoantipirina, produzindo um composto rosa (quinonimina) com máxima absorção em 505 nm. A intensidade da cor é proporcional à concentração de colesterol na amostra e as reações envolvidas são:



Quadro 3.1 Composição e cronograma da dieta hipercalórica, proposta por Rothwell et al. (1982)

Componentes da dieta	Quantidade em massa (g)	Período
Dieta 1: Biscoito de chocolate, suspiros, cheetos	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	1°-3° dias
Dieta 2: Pé-de-moleque, chocolate, biscoito de chocolate	5 g de cada componente/ camundongo/dia*	4°-6° dia

Dieta 3: Amendoim, baconzitos, suspiros	5 g de cada componente/camundongo/dia*	7°-9° dia
Dieta 4: Cheetos, rosquita de leite, amendoim	5 g de cada componente/camundongo/dia*	10°-12° dia
Dieta 5: Amendoim, biscoito de chocolate, baconzitos	5 g de cada componente/camundongo/dia*	13°-15° dia
Dieta 6: Rosquita de leite, baconzitos, amendoim	5 g de cada componente/camundongo/dia*	16°-18° dia
Dieta 7: Bolacha sortida, batata frita, amendoim	5 g de cada componente/camundongo/dia*	19°-21° dia
Dieta 8: Chocolate, queijo, pé-de-moleque	5 g de cada componente/camundongo/dia*	22°-24° dia
Dieta 9: Bolacha sortida, pé-de-moleque, queijo	5 g de cada componente/camundongo/dia*	25°-27° dia
Dieta 10: Queijo, rosquita de leite, bolacha sortida	5 g de cada componente/camundongo/dia*	28°-30° dia

* A ração hipercalórica foi acrescido 15 g adicionais de ração comercial padronizada para complementação da dieta.

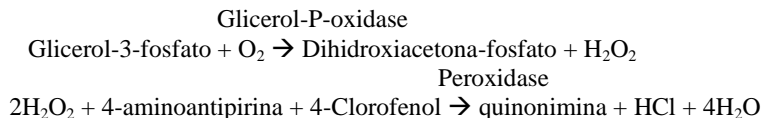
De forma semelhante, o método enzimático de determinação de triglicerídeos, o princípio está em que a enzima lipase lipoprotéica hidrolisa os triglicerídeos existentes na amostra, produzindo glicerol livre. A enzima glicerol quinase catalisa a fosforilação do glicerol livre pelo adenosina trifosfato (ATP) formando glicerol-3-fosfato que em presença de oxigênio sob a ação catalítica da enzima glicerol-P-oxidase, produz peróxido de hidrogênio. A enzima peroxidase catalisa a oxidação do reagente fenólico (4-clorofenol) pelo peróxido de hidrogênio formado, em presença de 4-amino-antipirina, produzindo um composto rosa (quinonimina), que apresenta máxima absorção em 505 nm. As reações envolvidas são:

Lipase

Triglicérides → Glicerol + Ácidos graxos

Glicerol quinase

Glicerol + ATP → Glicerol-3-fosfato + ADP



3.7 Encapsulamento de extrato de camarão por tecnologia supercrítica

O encapsulamento do extrato de camarão em polímero foi realizado em duas unidades diferentes de precipitação por Anti-Solvente Supercrítico (*Supercritical Anti-Solvent* - SAS), descritas a seguir (seções 3.7.1 e 3.7.2), no Grupo de Procesos a Alta Presión do Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente da Universidad de Valladolid (UVA), Valladolid/España.

Na unidade menor, foram avaliados os efeitos da pressão (80, 100 e 120 bar), temperatura (308,15, 313,15 e 318,15 K), vazão de solução precipitante (1,0, 2,0 e 3,0 mL/min) e concentração de extrato na solução de alimentação (2,0, 6,0 e 12,0 mg/mL). O extrato selecionado para os ensaios de encapsulamento foi o obtido através de maceração com acetona devido ao seu alto rendimento de extração e teor de astaxantina (resultados apresentados na seção 5.3.2). O solvente primário utilizado para formar a solução precipitante (solvente primário + extrato + polímero) foi acetona P.A., devido à alta solubilidade do extrato e polímero neste solvente, e às solubilidades alta e baixa da, respectivamente, acetona e astaxantina em CO₂ supercrítico nas condições avaliadas.

Dos 16 experimentos realizados em escala pequena, 4 condições operacionais foram selecionadas para o processo em maior escala, de acordo com os melhores resultados de formação de partícula apresentados na seção 8.3.1. Os experimentos em maior escala foram conduzidos levando em conta o critério de aumentar em 4 e 5 vezes as vazões de CO₂ e de solução precipitante dos experimentos em escala pequena respectivos. O polímero utilizado para todos os experimentos SAS, tanto em pequena como em escala grande, foi o Pluronic F127 aplicado na solução precipitante na concentração fixa de 10,0 mg_{polímero}/mL. O Pluronic F127 é um surfactante poliálcool não-iônico utilizado para facilitar a solubilização de corantes insolúveis em água (INVITROGEN, 2008).

Por fim, um experimento de SAS de emulsão (*Supercritical Fluid Extraction from and Emulsion* - SFEE) foi realizado nas melhores condições operacionais identificadas no estudo de SAS em pequena e escala grande, a fim de aprimorar o processo de encapsulamento

(eficiência de encapsulamento e tamanho médio das partículas), utilizando o amido modificado Hi-Cap 100 como material encapsulante (na concentração fixa de $2,4 \text{ mg}_{\text{amido}}/\text{mL}_{\text{água}}$), conforme detalhado na seção 3.7.3. O Hi-Cap 100 é um amido modificado, derivado de milho, utilizado para encapsulamento de saborizantes, vitaminas e especiarias. Este amido é caracterizado por uma excelente resistência à oxidação e é utilizado como agente de encapsulamento de menor custo, em substituição à goma arábica e à gelatina (NATIONAL STARCH, 2011).

A Tabela 3.1 apresenta as condições operacionais aplicadas a todos os experimentos SAS e SFEE, selecionadas de acordo com as limitações do equipamento e considerando trabalhos anteriores utilizando a mesma técnica para precipitação de carotenóides (COCERO e FERRERO, 2002; MIGUEL et al., 2006; MIGUEL et al., 2008). Os seis primeiros experimentos de SAS em escala pequena e os dois primeiros experimentos de SAS em escala grande, descritos na Tabela 3.1, apresentam condições experimentais iguais, a fim de avaliar a repetibilidade do processo.

3.7.1 SAS em escala pequena

A célula de precipitação utilizada para os experimentos SAS em escala pequena consiste de uma câmara em aço inoxidável AISI 316. As dimensões da célula são: volume de 0,096 L, altura de 3,5 cm e diâmetro interno de 10 cm. A célula está posicionada submersa em um banho de água controlado termostaticamente na temperatura de processo desejada. Dois conjuntos de filtros porosos de tamanho 10 e 1 μm estão posicionados sequencialmente após a câmara de precipitação e são utilizados para coletar as partículas de precipitado. Uma bomba de diafragma (Milroyal, Dosapro) e uma bomba de CLAE (PU980, Jasco) são usadas para alimentar o sistema com CO_2 supercrítico e solução orgânica precipitante. As bombas permitem trabalhar com um máximo de $1 \text{ kg}_{\text{CO}_2}/\text{h}$ e $10 \text{ mL}_{\text{solução}}/\text{min}$, respectivamente. As duas correntes (CO_2 e solução) são misturadas através de um bocal de tubos concêntricos posicionado no topo do vaso de precipitação. Assim, devido a alta solubilidade dos solventes orgânicos em CO_2 supercrítico, o solvente presente na solução precipitante é rapidamente solubilizado pelo CO_2 e, quando o sistema é depressurizado, é depositado no frasco coletor enquanto o CO_2 é descartado para o sistema de ventilação. As condições de temperatura e pressão são monitoradas utilizando instrumentos diretamente conectados ao vaso de precipitação, com certeza de medição de $\pm 1,0 \text{ K}$ e $\pm 0,2 \text{ bar}$, respectivamente. A vazão de

CO₂ foi controlada utilizando um medidor tipo coriolis, com precisão de medição de $\pm 0,1$ kg/h.

Os experimentos iniciaram pelo bombeamento de CO₂ puro para dentro do vaso de precipitação e pelo ajuste das condições de operação desejadas (temperatura, pressão de vazão) até alcançar a estabilidade dos parâmetros. Assim, aproximadamente 50 mL de solução de precipitação foram injetados no sistema na vazão desejada. Por fim, novamente apenas CO₂ puro foi bombeado durante 15 min para dentro da célula com a finalidade de garantir a secagem total das partículas. Subsequentemente a descompressão, as partículas precipitadas retidas nos filtros foram coletadas, armazenadas sob proteção de luz e em temperaturas abaixo de 263,15 K até posteriores análises de caracterização das partículas (procedimentos descritos na seção 3.8).

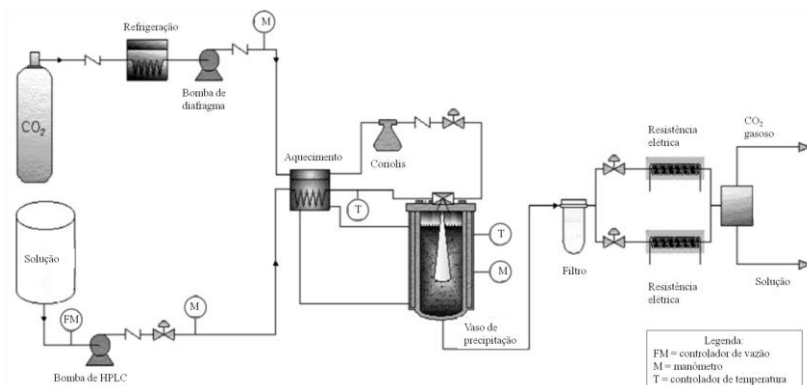
Tabela 3.1. Condições operacionais aplicados aos ensaios de encapsulamento por Anti-Solvente Supercrítico (SAS) e por SAS de emulsão (SFEE)

Processo-Unidade de precipitação	Pressão (bar)	Temperatura (K)	Vazão de CO ₂ (kg/h)	Vazão de solução (mL/min)	Concentração de extrato na solução (mg/mL)
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	1,0	2,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	1,0	2,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	1,0	2,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	2,0	6,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	3,0	6,0
SAS- Pequena	120	313,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	80	313,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	100	318,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	100	308,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	120	308,15	1,0	1,0	6,0

SAS- Pequena	80	308,15	1,0	1,0	6,0
SAS- Pequena	120	308,15	1,0	1,0	12,0
SAS- Pequena	100	313,15	1,0	1,0	12,0
SAS- Grande	100	313,15	4,0	4,0	6,0
SAS- Grande	100	313,15	4,0	4,0	6,0
SAS- Grande	100	308,15	4,0	4,0	6,0
SAS- Grande	100	313,15	4,0	4,0	12,0
SAS- Grande	100	313,15	5,0	5,0	6,0
SFEE-Grande	100	313,15	4,0	4,0	9,6

3.7.2 SAS e SFEE em escala grande

Um diagrama esquemático da planta piloto está apresentado na Figura 3.3. O precipitador de escala grande consiste de uma câmara em aço inoxidável AISI 316 encamisada, com dimensões de 2,5 L de volume (0,09 m x 0,405 m). Um filtro metálico poroso com tamanho de tela de 1 μ m está alocado no fundo do precipitador e é utilizado para coletar as partículas de precipitado. Uma bomba de diafragma (Milroyal, Dosapro) e uma bomba de CLAE (PU980, Jasco) são usadas para alimentar o sistema com CO₂ supercrítico e solução orgânica precipitante. As bombas permitem trabalhar com um máximo de 5 kg_{CO₂}/h e 10 mL_{solução}/min, respectivamente. Os dois fluxos (CO₂ e solução) são misturados através de um bocal de tubos concêntricos posicionado no topo do vaso de precipitação. Assim, devido a alta solubilidade dos solventes orgânicos em CO₂ supercrítico, o solvente presente na solução precipitante é rapidamente solubilizado pelo CO₂ que, quando o sistema é despressurizado, é depositado no frasco coletor enquanto o CO₂ é descartado para o sistema de ventilação. As condições de temperatura e pressão são monitoradas utilizando instrumentos diretamente conectados ao vaso de precipitação, com certeza de medição de $\pm 2,0$ K e $\pm 0,1$ bar, respectivamente. A vazão de CO₂ foi controlada utilizando um medidor tipo coriolis, com precisão de medição de $\pm 0,05$ kg/h. O procedimento experimental aplicado aos ensaios em escala grande foi o mesmo adotado para os em escala pequena. Detalhes complementares sobre o equipamento e procedimento experimental podem ser encontrado em Miguel et al. (2006). As partículas precipitadas retidas nos filtros foram coletadas, armazenadas sob proteção de luz e em temperaturas abaixo de 263,15 K até posteriores análises de caracterização das partículas (procedimentos descritos na seção 3.8).



Fonte: MIGUEL et al., 2006.

Figura 3.3 Diagrama esquemático da unidade de precipitação por SAS em escala grande

Para o experimento de SFEE, inicialmente se realiza a obtenção da emulsão óleo-em-água, realizada em três passos: (1) a suspensão de surfactante foi inicialmente preparada pela dispersão do surfactante em água deionizada (Milli-Q, Millipore) utilizando um agitador magnético; (2) em seguida, o extrato de resíduo de camarão foi dissolvido em diclorometano e a solução formada foi gradualmente adicionada a suspensão de surfactante e agitada continuamente durante 5 min, obtendo-se a mistura bruta; (3) a emulsão bruta foi então alimentada em um rotor emulsionador (IKA® LABOR PILOT 2000/4), com capacidade de 200 mL, e processado durante 2 min a 70000 rpm para a emulsificação fina da mistura. O sistema é refrigerado através de circulação de etilenoglicol na camisa do rotor, promovendo a remoção do calor gerado pelo equipamento e permitindo trabalhar nas temperaturas de 288,15 a 290,15 K. O tamanho de gota da emulsão resultante foi medida, de acordo com o procedimento descrito em 3.8.2, e o processo de SFEE imediatamente inicializado.

O experimento de SFEE foi realizado no equipamento apresentado na Figura 3.3, modificando a posição das conexões de entrada e saída do precipitador. Testes preliminares indicaram que a emulsão formada por Pluronic F127 e extrato do resíduo de camarão não era estável, provavelmente devido às inadequadas solubilidades da fase contínua (solução aquosa de surfactante) e da fase dispersa (solução de extrato em diclorometano), e/ou devido a obter-se um valor inapropriado de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), o qual está diretamente relacionado com o poder de estabilidade em um processo de

emulsificação. Assim, o amido modificado Hi-Cap 100 foi utilizado na concentração de $2.4 \text{ mg}_{\text{amido}}/\text{mL}_{\text{água}}$ para substituir a fase contínua de Pluronic F127. As condições operacionais utilizadas para o ensaio de SFEE foram: 100 bar, 313,15 K, $4,0 \text{ kg}_{\text{CO}_2}/\text{h}$, $4,0 \text{ mL}_{\text{emulsão}}/\text{min}$.

O procedimento consistiu em injetar o CO_2 supercrítico dentro da célula de precipitação até alcançar as condições de pressão e temperatura desejadas e mantê-las constantes. Em seguida, a emulsão foi injetada na vazão apropriada até que aproximadamente 200 mL de amostra fossem processadas. Por fim, o fluxo de CO_2 puro foi mantido por mais 15 min, na mesma vazão de processo, a fim de garantir a eliminação completa do solvente orgânico. Após a interrupção do suprimento de CO_2 , o sistema foi despressurizado e a suspensão removida. A suspensão resultante foi então submetida a análise de tamanho de partícula em suspensão, de acordo com o procedimento descrito em 3.8.2.

3.8 Caracterização dos produtos de encapsulamento em meio supercrítico

3.8.1 Tamanho das partículas encapsuladas

Amostras de partículas produzidas pelos processos de precipitação SAS foram analisadas através de um microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-820, JEOL, no Laboratorio de Ensayos Industriales de Castilla y León da UVA. Uma camada de ouro pulverizado foi utilizada para cobrir as amostras e permitir a reflexão de luz durante a avaliação das partículas. O tamanho médio de partícula foi medido através do software ZEISS image analysis. No caso do ensaio SFEE, a suspensão obtida foi primeiramente seca em *spray-dryer* (MM-Basic-PSR, Mobile MinorTM) e as partículas resultantes foram então analisadas pelo método de MEV descrito previamente. As medidas de MEV foram realizadas em quadruplicata para cada amostra analisada.

3.8.2 Distribuição do tamanho de gota da emulsão e de partícula da suspensão

A distribuição de tamanho da gota da emulsão e de partícula da suspensão foram medidas utilizando um instrumento de difusão dinâmica de luz (Autosizer Lo-C, Malvern Instruments Ltd.) no Grupo de Procesos de Alta Presión da UVA. Este instrumento é equipado com um laser de diodo (λ : 670 nm) e foi configurado para medir tamanhos de gotas/partículas entre 0,02 e $10 \mu\text{m}$. A distribuição de tamanho foi determinada para a emulsão inicial (antes do procedimento de SFEE) e

para a suspensão obtida após o processo de SFEE. O procedimento de difusão dinâmica de luz foi realizado em triplicata para cada amostra.

3.8.3 Interação entre polímero e extrato encapsulado nas partículas produzidas

A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica termoanalítica aplicada, por exemplo, a partículas produzidas por precipitação a fim de observar o grau de encapsulamento dos compostos de interesse no polímero. Essa análise concede informações sobre a interação entre o composto carregador (polímero) e o material encapsulado, e também sobre a cristalinidade das substâncias comparadas ao composto padrão (por exemplo, o polímero puro) (COCERO et al., 2009). Neste trabalho, os perfis diferenciais de calorimetria foram determinados para as partículas obtidas pelos seguintes procedimentos: SAS em escala pequena a 100 bar, 313,15 K, 1:1 (kg_{CO2}/h)/(mL_{sol}/min) e 2,0 mg_{extrato}/mL; SAS em escala grande (critério de 4 e 5 vezes) a 100 bar, 313,15 K, 1:1 (kg_{CO2}/h)/(mL_{sol}/min) e 6,0 mg_{extrato}/mL; SAS em escala pequena a 100 bar, 308,15 K, 1:1 (kg_{CO2}/h)/(mL_{sol}/min) e 6,0 mg_{extrato}/mL. O equipamento utilizado foi o calorímetro diferencial DSC 822e Mettler Toledo SAE, no Laboratorio de Ensayos Industriales de Castilla y León da UVA, e as condições de análise foram: atmosfera de nitrogênio, taxa de aquecimento de 10 K/min, aplicada a temperaturas entre 303,15 K e 503,15 K.

3.8.4 Eficiência de encapsulamento de astaxantina

As amostras de partículas obtidas por todos os processos de encapsulamento (SAS em pequena e escala grande, SFEE) foram analisadas quanto ao seu teor de astaxantina de acordo com o procedimento de CLAE descrito na seção 3.6.1. As eficiências em encapsulamento de astaxantina foram então calculadas pela relação entre o conteúdo de astaxantina presente nas partículas encapsuladas e o conteúdo teórico de astaxantina, o qual representa o conteúdo total de astaxantina inserido no vaso de precipitação equivalente a 100% de eficiência de encapsulamento.

3.8.5 Estabilidade de cor dos produtos encapsulados

O efeito do processo de encapsulamento na estabilidade de cor do extrato de resíduo de camarão foi determinado através de análise espectrofotométrica para todas as amostras produzidas pelos processos de SAS e SFEE no Grupo de Procesos a Alta Presión da UVA. As amostras submetidas a análise de estabilidade seguiram o procedimento

descrito por Gradinaru et al. (2003). Inicialmente, uma varredura na região do visível foi realizada para o extrato puro em solução a fim de determinar a máxima absorbância no âmbito de comprimento de onda associado a classe de compostos dos carotenóides, entre 430 e 470 nm. A seguir, o extrato puro e as amostras precipitadas foram dissolvidas em água destilada nas concentrações em que a absorbância inicial estivesse entre 0,8 e 1,0. Então, as soluções de amostras foram mantidas a temperatura ambiente, atmosfera de oxigênio e exposição a luz a fim de induzir a degradação dos carotenóides. A análise foi realizada em triplicata através do monitoramento da degradação dos carotenóides através de medidas periódicas da absorbância até 7 dias de exposição, usando um espectrofotômetro UV-Visível (U-2000, Hitachi). Os resultados foram expressos em percentual de conservação de cor, comparando os dados de absorbância inicial e os respectivos períodos de exposição a condições de degradação.

3.9 Análise estatística

Os resultados de rendimento de extração, conteúdo total de carotenóides, conteúdo dos diferentes carotenóides identificados, capacidade antioxidante e concentração efetiva pelo método do DPPH, capacidade antioxidante pelo método de descoloração do β -caroteno, conteúdos de colesterol e triglicerídeos (efeito hipolipemiante), ganho de peso dos camundongos (efeito anti-obesidade) e eficiência de encapsulamento de astaxantina foram estatisticamente analisados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância com o auxílio do software Statística 6.0. Se, segundo a ANOVA existiu diferença significativa ao nível de 5 % de significância entre as médias dos tratamentos, deu-se continuidade à análise aplicando o teste de Tukey o qual avalia as diferenças entre os pares de tratamentos.

3.10 Quadro de experimentos

O Quadro 3.2 apresenta um resumo das atividades realizadas em função do capítulo onde os respectivos resultados estão apresentados, e do período de realização durante a totalidade do curso de doutorado.

3.11 Referências

ABELL, L. L.; LEVY, E. B.; BRODIE, B. B.; Kendall, F. E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 357-366, 1952.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K. M. **International thermodynamic tables of the fluid state: Carbon dioxide**. Oxford: Pergamon Press, 1976.

A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 11th ed. Washington. D.C. 1141, 1990.

A. O. C. S. - American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society**. Method Ce 1f-96– Determination of Cis- and Trans-Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC, 2002.

BUCOLO, G.; DAVID, H. **Quantitative Determination of Serum Triglycerides by the Use of Enzymes**. Clinical Chemistry, v 19, p. 476-482, 1973.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413-8420, 2008.

CHEN, H.M.; MEYERS, S. Ensilage treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 1516 –1520, 1555, 1982.

COCERO, M. J.; FERRERO, S. Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch. Effect of operating conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 237-241, 2002.

COCERO, M. J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; SALIMA, V. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.

Quadro 3.2 Resumo dos ensaios realizados em função do capítulo e período de realização durante a totalidade do curso de doutorado

Capítulo	Atividade/Semestre	2008	2009	2010	2011
Cap. 4	Estudo da unidade de ESC				
	Seleção de peças e equipamentos				
	Projetos de equipamentos e estrutura da unidade				
	Orçamentos e pedido de compra de peças/equipamentos				
	Montagem e testes de funcionamento da unidade				
Cap. 5	Revisão bibliográfica (extração e avaliação dos extratos)				
	Avaliação das técnicas de pré-tratamento da matéria-prima				
	Realização das extrações convencionais				
	Quantificação do teor de carotenóides, perfil no UV-Vis-IR				
	Avaliação dos resultados e redação do artigo				
Cap. 6	Revisão bibliográfica (ESC)				
	Preparo da matéria-prima e ensaios cinéticos				
	ESC com CO ₂ puro e co-solvente				
	Quantificação do teor de carotenóides e perfil UV-Vis				
	Modelagem matemática e determinação dos custos				
Cap. 7	Avaliação dos resultados e redação do artigo				
	Revisão bibliográfica (atividades biológicas do resíduo)				
	Determinação da capacidade antioxidante (DPPH)				
	Determinação da capacidade antioxidante (β -caroteno)				

	Análise de índice de polifenóis e perfil de ácidos graxos				
	Determinação da atividade hipolipemiante e anti-obesidade <i>in vivo</i>				
	Avaliação dos resultados e redação do artigo				
Cap. 8	Revisão bibliográfica (precipitação em meio supercrítico)				
	Aprendizagem e testes das técnicas de precipitação				
	Co-precipitação de extrato de camarão por SAS e SFEE				
	Avaliações analíticas dos precipitados				
	Avaliação dos resultados e redação do artigo				
	Redação da tese final				
	Publicações em congressos e periódicos				
	Defesa final				

DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1054-1059, 2007.

FIORI, L.; CALCAGNO, D.; COSTA, P. Sensitivity analysis and operative conditions of a supercritical fluid extractor. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1, p. 31-42, 2007.

FOOD AND DRUG REGULATION. Available in: <http://laws.justice.gc.ca/en/F-27/C.R.C.-c.870/124366.html#rid-12437>, Department of justice, Canada, 2005.

GASPAR, F.; LU, T.; SANTOS, B.; AL-DURIN, B. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**. v.25. n. 3, p.247-260, 2003.

GRADINARU, G.; BILIADERIS, C. G.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P.; GARCIA-VIGUERA, C. Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. **Food Chemistry**, v. 83, p. 423-436, 2003.

GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y.; CHEN, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT**. v. 41, p. 1082–1088, 2008.

INVITROGEN. **Technical Bulletin of Pluronic F127**. MP 03000, 2008.

KING, M.B.; KASSIM, K.; BOTT, T.R. Mass transfer into near-critical extractants. **Fluid Phase Equilibria**, v. 10, n. 2-3, p. 249-260, 1983.

KITZBERGER, C. S. G.; LOMONACO, R. H.; MICHIELIN, E. M. A.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 35-43, 2009.

KUHNEN, S.; LEMOSA, P. M. M.; CAMPESTRINI, L. H.; OGLIARIA, J. B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 284-290, 2009.

MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent Model To Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial Engineering of Chemistry Research**, v. 42, p. 1057-1063, 2003.

MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444-52, 2002.

- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant extracts for antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical method. **Phytotherapy Research**. v.15, p. 127-130, 2001.
- MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 33, p. 131–138, 2005.
- MIGUEL, F.; MARTÍN, Á.; GAMSE, T.; COCERO, M. J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene. Effect of the operating parameters. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 225-235, 2006.
- MIGUEL, F.; MARTÍN, Á.; MATTEA, F.; COCERO, M. J. Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. **Chemical Engineering Process**, v. 47, p. 1594-1598, 2008.
- NATIONAL STARCH FOOD INNOVATION. **Technical Service Bulletin: HI-CAP 100^{RM}**. 2011.
- PERDIGÃO, N. B.; VASCONCELOS, F. C.; CINTRA, I. H. A.; OGAWA, M. Extração de carotenóides de carapaças de crustáceos em óleo. **Boletim Técnico Científico da CEPENE**, v. 3, n. 1, p. 234-246, 1995.
- PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BRUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137–150, 2005.
- POWELL, M. J. D. **Subroutine BOBYQA**. Department of Applied Mathematics and Theoretical Physics, Cambridge University (2009).
- REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POULING, B. E. **The Properties of Gases and Liquids**. McGraw-Hill, 1986.
- ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994–2003). **Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 109–117, 2005.
- ROTHWELL, N. J.; SAVILLE, M. E.; STOCK, M. J. Effects of Feeding a “Cafeteria” Diet on Energy Balance and Diet-Induced Thermogenesis in Four Strains of Rat. **Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1515-1524, 1982.
- 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.
- SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1195-1200, 2005.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 299p, 1979.
- SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**. v.49, n. 3, p. 409-414, 1994.
- TAN, C. S.; LIANG, S. K.; LIOU, D. C. Fluid—solid mass transfer in a supercritical fluid extractor. **The Chemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 17-22, 1988.

TURTON, R.; BAILIE, R. C.; WHITING, W. B.; SHAEIWITZ, J. A. **Analysis, synthesis, and design of chemical process**. PTR Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998.

WAKAO, N.; KAGUEI, S. **Heat and Mass Transfer in Packed Beds**. Gordon and Breach, New York, 1982.

WELTY, J. R.; WICKS, C. E.; WILSON, R. E. **Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer**. New York: John Wiley & Sons, 1983.

CAPÍTULO 4: CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO A ALTA PRESSÃO

As pesquisas relacionadas com a extração de carotenóides, compostos fenólicos, antitumorais, antioxidantes, cicatrizantes, entre outros componentes com propriedades bioativas, vêm crescendo muito nos últimos anos. Em especial, a utilização de CO₂ supercrítico como solvente a extração dessas substâncias bioativas a partir de matérias-primas naturais ou resíduos agroindustriais vem ganhando merecido espaço devido às inúmeras vantagens deste processo perante as técnicas convencionais, tais como: ser um processo livre de resíduos tóxicos; não necessitar de pós-processamento dos extratos para a eliminação do solvente; não provocar a degradação térmica dos extratos por permitir o emprego de baixas temperaturas; prevenir reações de oxidação pela ausência de luz e oxigênio; ser um processo flexível devido à possibilidade de ajuste contínuo do poder de solvatação e seletividade do solvente (BRUNNER, 1994; MARTÍNEZ et al., 2004; ROSA e MEIRELES, 2005; MICHIELIN et al., 2005; DÍAZ-REINOSO et al., 2006).

Assim, a construção de um equipamento a alta pressão que permita trabalhar com pressões de até 400 bar se torna necessária para o estudo da extração supercrítica de diversas matérias-primas, em especial resíduos agroindustriais, extensivamente estudados no LATESC. Este capítulo, portanto, atende ao seguinte objetivo específico, de acordo com a seção 1.2: projetar e construir uma unidade de extração supercrítica para operar com pressões de até 400 bar e com emprego de co-solvente para obtenção de extratos de produtos naturais. Os dados relativos ao projeto e construção do equipamento de ESC estão apresentados no Anexo I deste documento.

CAPÍTULO 5: SISTEMAS A BAIXA PRESSÃO PARA CONCENTRAÇÃO DE CAROTENÓIDES DO RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA

Este capítulo se refere ao estudo de técnicas de pré-tratamento da matéria-prima e das técnicas convencionais de extração de carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa. Este estudo atende aos seguintes objetivos específicos da presente tese, de acordo com a seção 1.2: avaliar a influência das técnicas de pré-tratamento da matéria-prima (tratamento térmico, secagem e/ou moagem) do resíduo de camarão rosa a fim de liberar os compostos carotenóides para a sua extração; avaliar o efeito do solvente e do método de extração a baixa pressão na recuperação de carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa; e caracterizar os extratos obtidos pelas técnicas de extração com relação ao perfil de carotenóides, os espectros no UV-Visível e no infravermelho médio. A matéria-prima utilizada neste trabalho foi obtida no mercado público de Florianópolis/SC/Brasil e submetida a diferentes pré-tratamentos como tratamento térmico, secagem e moagem, sendo que estes métodos combinados apresentaram a melhor recuperação da fração carotenóidica da matéria-prima. Subsequentemente, foi estudada a eficiência de extração de carotenóides de sistemas de solventes. Os resultados foram avaliados quanto ao rendimento de extração, o perfil quali/quantitativo de carotenóides, o rendimento em astaxantina e os espectros no UV-Visível e no infravermelho médio (FTIR) dos diferentes extratos. A composição dos extratos convencionais indicou a acetona e a mistura hexano:isopropanol como os solventes de maior eficiência na extração de carotenóides.

O trabalho completo realizado neste capítulo está apresentado no formato de artigo, de acordo com o formato exigido pelo periódico *Talanta*, o qual publicou este trabalho*.

Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration

ABSTRACT

The main residue from the shrimp processing is formed by head and carapace and represents from 40 to 50 % (w/w) of the integral shrimp. The recovery of the carotenoid fraction from this residue stands for an alternative to increase its aggregated value. Therefore, the objective of this study was to use the pink shrimp waste as raw material to obtain carotenoid enriched extracts, evaluating different pre-treatments and extraction methods. The shrimp waste was supplied by a local public market (Florianópolis, SC, Brazil). The investigation of the different pre-treatments applied to the raw material shows that heat treatment associated with milling and drying produced the extract richest in carotenoid fraction. The extraction methods considered in this work were Soxhlet, maceration and ultrasound by means of different organic solvents and also a vegetable oil as solvent. The extracts were evaluated in terms of yield, carotenoid profile, total carotenoid content (TCC), UV-Visible scanning spectrophotometry and mid-Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The results indicate that shrimp waste can provide carotenoid enriched extracts, particularly astaxanthin, in concentrations up to $252 \mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}_{\text{extract}}$. The most adequate solvents were acetone and hexane:isopropanol (50:50, v/v) used in the maceration procedure. The UV-Vis results revealed the presence of carotenoids and flavonoids in the extracts while the FTIR spectroscopy indicated the existence of fatty acids, proteins, and phenolics.

Keywords: Total carotenoid content; Astaxanthin; UV-Vis spectrophotometry; FTIR.

5.1 Introduction

According to the **Food and Agriculture Organization of the United Nations** (FAO), the worldwide capture production of marine crustaceans was, in 2009, the total of five thousands ton (FAO, 2010). The Brazilian participation in this global production is continuously increasing, particularly in the State of Santa Catarina, which is the largest Brazilian producer of marine fishery. In 2007, the Santa Catarina

State (Brazil) reached 39 % increase in the crustacean production, compared to 2006 (IBAMA, 2008).

The shrimp, one of the major crustacean's subclasses, can be commercialized fresh (*in natura*) or processed. The processed shrimp generates an industrial waste composed mainly by head and carapace, or the cephalothorax (HUANG et al., 2010). The head consists of 35 % to 40 % w/w of raw material, whereas the carapace is around 7% w/w. Therefore, these residues represent from 40 to 50 % w/w of raw material (SIMPSON and HAARD, 1985) and are potentially considered as environmental contaminants when improperly disposed (SHAHIDI and SYNOWIECKI, 1991; FAMINO et al., 2000).

The shrimp residue is a potential source of food ingredients due the presence of important components in the cephalothorax. Therefore, the study and the development of new products by means of the shrimp residue, such as extracts, is relevant because of the high aggregated value of the final product (residue extract) and because of the reduction in the environmental impact due to the processing of shrimp residue. Consequently, the shrimp waste can be used to obtain extracts that contain carotenoid components, like astaxanthin, which are bioactive substances highly demanded by the food and pharmaceutical industries.

The strong association between the carotenoids and other macromolecules from the residue, such as proteins and fatty acids, demands an adequate raw material pre-treatment. According to literature, the most successful pre-treatments used to recover carotenoids from microorganisms, crustaceans and algae are: heat treatment and drying (PERDIGÃO et al., 1995), ultrasound, chemical treatment with liquid nitrogen and dimethyl sulfoxide (KAISER et al., 2007; MACÍAS-SANCHEZ et al., 2009), milling and acid or enzymatic hydrolysis by means of lysozyme, lipase, lyticase or catalase (OMARA-ALWALA et al., 1985; KAISER et al., 2007; GU et al., 2008).

Organic solvents have been used for the extraction and recovery of carotenoids from natural sources (MEYERS and BLIGH, 1981; TAUNGBODHITHAM et al., 1998; LÓPEZ et al., 2004) and their efficiency is related to the high temperatures used and to the solvent-solute interactions (MARKOM et al., 2007). After the extraction, the recuperation of the solvent is essential due to environmental and economical problems. The limitations of the organic solvent extraction

procedures, the so called conventional methods, are: high energy costs; elevated amount of solvent; time consuming process; use of high temperatures, affecting thermo labile substances; and presence of solvent vestiges in the solute (extract) (CAMPOS et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010).

Vegetable oils have also been successfully used as solvents for the extraction of carotenoid components from vegetal sources and crustaceans (MEYERS and BLIGH, 1981; SHAHIDI and SYNOWIECKI, 1991; GILDBERG and STENBERG, 2001). The advantage of using vegetable oils is that they are considered a good barrier against oxygen, which reduces the oxidation processes. The vegetable oils can also contribute as energy source if the product (carotenoid in vegetable oil) is subsequently applied in foods formulations (SHAHIDI and SYNOWIECKI, 1991).

Therefore, considering the environmental, economical, quality and process aspects discussed above, the main objective of this work is to evaluate the application of pink shrimp residue as a source of carotenoid compounds. Different pre-treatments of the raw material were evaluated in order to make the carotenoid fraction available for the extraction procedures, performed by different techniques and solvents. The methods were then evaluated by the characterization of the extracts by means of the analysis of the chemical composition and the recovery efficiency of the carotenoid fraction from the shrimp residue.

5.2 Materials and methods

The procedure proposed in this work consisted of: (a) selection of the pre-treatment for the raw material, including heat treatment, drying and milling, according to the carotenoid content of the treated material, measured by a classical extraction procedure; (b) study of different extraction methods: after defined the adequate pre-treatment (selected in step a), the treated raw-material was submitted to different extraction procedures (Soxhlet, maceration and ultrasound, with different organic solvents and with edible oil as solvent) and the resulting extracts were evaluated in terms of carotenoid profile. The experimental procedures are detailed below.

5.2.1 Raw material

The raw material consists of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) waste, composed essentially by head, carapace, and tail. The residue was provided by *Peixaria Nelson Santos* (Florianópolis, Santa Catarina, southern Brazil), sited at the local public market. The residue from the shrimp processing was supplied as one sample, representative from the high season production in May, 2010.

5.2.2 Pre-treatment methods

The shrimp waste was submitted to the following pre-treatments, before the extraction procedures: (a) *in natura* (without pre-treatment), (b) *in natura* milled; (c) dried and milled; (d) heated, (e) heated and milled; (f) heated, dried and milled, according to the procedures detailed in section 3.2. The efficiency of different pre-treatments was evaluated according to the availability, for the extraction, of the carotenoid compounds present in the pre-treated raw material. The effectiveness of these procedures was determined by the classical method of extraction and the carotenoid quantification according to the methods detailed in sections 5.2.3 and 5.2.4, respectively.

5.2.3 Classical method of carotenoid extraction

The extraction of pigments from the carotenoid family followed the classical method presented by Chen and Meyers (1982) and was performed in triplicate. Briefly, 5 g of shrimp waste samples (*in natura* and pre-treated) were added to 200 mL of a solvent mixture (petroleum ether: acetone: water, 15:75:10, v/v/v), left to rest for 24 h at 278.15 K (protected from light), filtered, and the lipid fraction was evaporated in a rotary evaporator with reduced pressure (550, Fisatom). The results obtained were expressed as extraction yield in % w/w in dry basis.

5.2.4 Total carotenoid content (TCC)

The total carotenoid content (TCC) was based on the carotenoid profile results (section 5.2.6.1) by considering the integration of the all carotenoid components present in the extract samples. The TCC was evaluated for the pink shrimp extracts obtained by the conventional method of carotenoid extraction (section 5.2.3), applied for the samples submitted to the different pre-treatments (section 5.2.2). The TCC

analysis was performed in triplicate and the results were expressed in $\mu\text{g/g}$ of extract.

The most adequate pre-treatment, selected among the procedures described in section 5.2.2 for use in the second part of this work (study of the different extraction methods), was defined based on the higher TCC value, allied with the higher extraction yield by the classical method (section 5.2.3).

5.2.5 Extraction techniques

The different extraction techniques, applied to the pre-treated shrimp residue (pre-treatment selected according to section 5.3.1), were compared in terms of yield and extract characterization. The pre-treated raw material was also characterized in terms of the following physical-chemistry aspects: total nitrogen content, moisture content, and total ash content, according to the A.O.A.C. (1990) methods 991.20, 925.09 and 923.03, respectively (for details, please see section 3.3). The results are expressed in % w/w, wet basis (w.b.).

The extraction methods studied in this work (Soxhlet, maceration, ultrasound and vegetable oil extraction) are described below (for details, please see section 3.4).

5.2.5.1 Soxhlet extraction (SOX)

Soxhlet extraction (SOX) method was performed in triplicate and based on the procedure described by Campos et al. (2008). Briefly, the raw material (5 g) was packed inside a cartridge and transferred to a 250 mL extractor device and submitted to 8-hour recycling extraction with 150 mL solvent at boiling temperature. The extraction was performed with the following solvents (P.A., Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA., Brazil): *n*-hexane (Hx); ethanol (EtOH); acetone (Ac); isopropanol and isopropanol:hexane (50:50, v/v). All of the used solvents are authorized by General Recognized as Safe (GRAS) solvents and are usually used in food industry (FOOD AND DRUG REGULATION, 2005). The extracts were concentrated in a rotatory evaporator and the extraction yield was calculated in dry basis (d.b.) and expressed in % w/w, d.b.

5.2.5.2 Maceration (MAC)

The maceration (MAC) method consists in a cold extraction of the pre-treated shrimp residue in organic solvent to avoid thermal degradation. The procedure was performed according to Sachindra et al. (2006). Briefly, it consists of transferring 25 g of the sample into 100 mL of selected organic solvent for five days at room temperature, light protection and one daily manual agitation. Each extraction was performed in triplicate using the solvents Hx, EtOH, Ac, IPA, and the binary Hx:IPA (50:50, v/v). The mixture of raw material, extract and solvent was separated by means of cellulose filtration, followed by concentration under vacuum. The extraction yield was calculated in dry basis (d.b) and expressed in % w/w, d.b.

5.2.5.3 Ultrasound extraction (UE)

The ultrasound extraction (UE) was performed in triplicate and adapted from Gu et al. (2008). Briefly, it consists of adding 5 g of raw material in 150 mL of EtOH, maintaining the solution into an ultrasound apparatus (UtraCleaner 700, 55 kHz, 40 VA, Unique, Indaiatuba/SP/Brasil) for 10 min. The extract was separated from the raw material by centrifugation (Q222T, Quimis) at 2,000 g for 20 min and concentrated under vacuum. The extraction yield was then calculated in dry basis (d.b) and expressed in % w/w, d.b.

5.2.5.4 Hot and cold oil extraction (OilH and OilC)

The extraction methods using vegetable oil as solvent were classified according to the solvent temperature. The cold extraction (OilC) and the hot extraction (OilH) with vegetable oil, performed according to the procedure presented by Sachindra and Mahendrakar (2005) and realized in triplicate. The extraction yield was evaluated using sunflower oil and soybean oil as solvents (Liza, Cargill Inc.). The method consists of mixing 10 g of raw material with 40 mL of vegetable oil in a 250 mL flask (light protected), submitted to hot plates with 2h-agitation period at room temperature (OilC) or at 343,15 K (OilH). Further, the oil extracts were recovered by cellulose filtration. The final product of hot and cold oil extraction, differently of other extractions methods performed (MAC, SOX and UE), is an oily product enriched of carotenoids. Then, the extraction yield of OilH and OilC was quantified by the total

carotenoid content, as expressed by section 5.2.6.1, and they are referred to the pigments (carotenoids) extraction yield.

5.2.6 Extract characterization

The characterization of the different extracts from shrimp residue obtained by the various extraction methods (section 5.2.5) was determined in terms of carotenoid profile, UV-Visible spectrum and Infrared spectroscopy, as presented below:

5.2.6.1 Carotenoid profile

Shrimp residue extracts, obtained through the above described protocols, were properly homogenized in *n*-hexane (2 mL) and the resulting solution was centrifuged at 3,000 *g* during 5 min. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and followed the procedure described by Kuhnen et al. (2009), as extensively described in section 3.6.1. The results obtained by HPLC analysis was expressed in terms of (1) carotenoids concentration, obtained by the relative quantification of each components; (2) total carotenoid content (TCC), obtained by the sum of the amount from all carotenoids indentified; (3) astaxanthin yield calculated considering extraction yield (section 5.2.5) and the astaxanthin content.

5.2.6.2 UV-Visible spectrum

The extracts (20 mg) were transferred to amber flasks, homogenized with 10 mL of *n*-hexane and, then, manually agitated. The UV-Visible scanning profile of samples was obtained through an UV-Visible spectrophotometer (Hitachi, model U-1800), for a spectral window of 200 to 750 nm, and performed in triplicate.

5.2.6.3 Infrared Spectroscopy

The mid-Fourier transform infrared (FTIR) vibrational spectroscopy analysis was carried out using a Bomem spectrometer (FTLA2000, Bomem, Inc. Quebec, Canada) equipped with DTGS (deuterated triglycine sulfate) detector, according to the method of Silverstein (1979), described in section 3.6.3. The extracts samples analyzed by the FTIR procedure were obtained by maceration with ethanol and by acetone, selected for this analysis because of their discrepant profiles

(different classes of components detected, as presented in section 5.3.2.4) determined by UV-Vis scanning spectrophotometry in comparison to other samples.

5.2.7 Statistical Analysis

The extraction yield, the TCC results and the carotenoid contents from HPLC were statistically evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA), using the statistical package Statistica for Windows 6.0 (Statsoft Inc., USA). The significant differences at level of 5 % were analyzed by Tukey test.

5.3 Results and discussion

5.3.1 Raw material pre-treatment

The yield and the TCC values, by means of the classical carotenoid extraction, for all pre-treatments applied to the shrimp residue are presented in Table 5.1. According to these results, the lowest yield was achieved by the *in natura* sample (a), when no pre-treatment was used (12 ± 3 %). This yield result was statistically equal to all values from other samples, except for the heated/dried/milled sample which, otherwise, showed the highest yield value (23.5 ± 0.5 %).

Comparing the yield data from Table 5.1 for the pre-treatments (a), (b), (d) and (e) we observe that, the milling procedure did not statistically improve the extraction yield. The effect of heat treatment and drying pre-treatments is observed by comparing the results for assays (a)-(d); (b)-(e) and (b)-(c), where no statistically significance was detected on yield results. Besides that, the heat treatment procedure affected significantly the extraction yield, especially when combining drying and milling processes, as observed comparing assays (a) and (b) with (f). These results suggest that milling and drying processes do not significantly affect the yield results for non heated samples, probably because the heat treatment procedure breaks the carotenoid-protein complex from the raw material, increasing the extraction yield.

The conventional extraction method provided the maximum TCC value of $34.2 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{extract}}$ for the (d) heated sample, followed by $29.2 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{extract}}$ for the (f) heated/dried/milled sample, while the minimum TCC value was $14.2 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{extract}}$ for the (a) *in natura* sample (Table 5.1). The milling procedure affected significantly the

TCC values for *in natura* samples (milled and not milled), probably due to the increase in the amount of exposed solute (outside the solid particles), caused by the enlargement in surface area with the particle size reduction and, then, enhancing the mass transfer by the convection mechanism. In addition, the particles reduction is operationally necessary and diminishes the solvent pathway to reach the solute inside the solid matrix, e.g., improving the diffusion mechanism (MEZZOMO et al., 2009).

Table 5.1 Extraction yield (EY), total carotenoid content (TCC) em process productivity for extracts of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) waste submitted to different pre-treatments and obtained by the conventional extraction.

Assay	Raw material pre-treatment	Solvent polarity Index ¹	EY (w/w %, d.b.) ^{2,3}	TCC ($\mu\text{g}/\text{g}_{\text{extract}}$) ²	Process productivity (EY x TCC)
(a)	<i>In natura</i>	4.74	12 ± 3 ^a	14.2 ± 0.2 ^a	170
(b)	<i>In natura</i> milled	4.74	16 ± 3 ^a	18.1 ± 0.2 ^b	290
(c)	Dried and milled	4.74	18.6 ± 0.2 ^a	15 ± 1 ^a	279
(d)	Heated	4.74	15 ± 2 ^a	34.2 ± 0.5 ^d	513
(e)	Heated and milled	4.74	13.5 ± 0.6 ^a	27 ± 1 ^c	365
(f)	Heated, dried and milled	4.74	23.5 ± 0.5 ^b	29.2 ± 0.3 ^c	686

¹BYERS, 2009; ²Same letter same column indicate no significant difference ($p < 0.05$); ³Obtained by the conventional method for carotenoid extraction for 24 h, in a solvent/raw material ratio of 40 mL/g.

Perdigão et al. (1995) evaluated the carotenoids extraction from *in natura* and cooked lobster carapaces and reported low extraction yield from *in natura* samples (without heat treatment) compared to the heated ones. The authors suggested that the heat treatment process can break the carotenoid-protein complex, releasing the carotenoid compounds and facilitating its extraction. Additionally, the authors concluded that a higher extraction yield was obtained for lower moisture content, emphasizing the importance of the drying procedure. Hornero-Méndez and Mínguez-Mosquera (2007), studying the heat treatment effect on carotene bioavailability in carrots reported that, although thermal treatment during heat treatment showed a negative impact on the

carotenoid content, it also promotes a positive effect on carotene micellarisation and, therefore, on their bioavailability.

The heat treatment effect on carotenoid recovery was also observed in the present study. The best pigment recovery, represented by the highest TCC values, was achieved by the heated samples, as presented in Table 5.1. The use of “heat treatment” as the only pre-treatment process results in higher TCC value, when compared to heated/dried/milled procedure, although it provides lower extraction yield. Otherwise, the sample pre-treated combining all procedures (heat treatment, drying and milling) reached observing the process productivity (extraction yield \times total carotenoid content) and, then, it was considered the most important procedure to improve the carotenoid extraction (higher extraction efficiency). As a consequence, this pre-treatment procedure (heat treatment/drying/milling) was selected for the following studies to evaluate the different extraction techniques.

5.3.2 Extraction techniques

5.3.2.1 Extraction yield

According to the results for the pre-treatment evaluation (Table 5.1), the raw material submitted to heat treatment, drying, and milling presented the best results (yield and TCC) and was selected for the extraction systems study. Therefore, the pre-treated raw material was evaluated according to its physical-chemical composition and the results revealed a total nitrogen content of 26.09 ± 0.01 % (w/w, w.b.), a moisture content of 46.30 ± 0.06 % (w/w, w.b.), and an ash content of 17 ± 2 % (w/w, w.b.). The predominance of proteins and minerals (nitrogen and ash contents) from the shrimp residue studied in this work was also detected by Heu et al. (2003) for the residue from Northern pink shrimp (*P. borealis*) and spotted shrimp (SS, *Trachypena curvirostris*). The protein content of 26.09 ± 0.01 %, observed in this work (residue from *P. brasiliensis* and *P. paulensis*), was superior to the head residue from other shrimp species presented in the literature (BABU et al., 2008), e.g., *P. mondon* (11.3 %), *P. indicus* (12.3 %), and *M. monoceris* (11.2 %). The mineral content of 17 ± 2 % was also superior to that observed by Babu et al. (2008), which varied from 8.2 % to 11.8 % for the species cited above. The differences between the physical-chemical results of raw material from the present work and from the literature

suggest the influence of shrimp species and the part of shrimp waste treated.

The extraction yield and TCC values for the heated, dried and milled raw material (pre-treatment), obtained by means of the different extraction techniques are presented in Table 5.2, together with the solvent polarity index, the solvent/solid ratio and the extraction time. Comparing the conventional method of carotenoid extraction (Table 5.1) with other extraction techniques (Table 5.2), it was observed that only the Soxhlet with ethanol method presented an extraction yield much higher than the conventional method, with values of $68 \pm 6 \%$ and $23.5 \pm 0.5 \%$, respectively. Alternatively, when we compare the results in terms of TCC values, the data from Table 5.2 indicate several procedures more efficient in obtain carotenoid compounds, with values up to $253 \pm 7 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$ for the maceration with acetone, compared to the value of $29.2 \pm 0.3 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$ for the conventional result (Table 5.1). The conventional method (Table 5.1) requires high amount of solvent and 24 hours of extraction time to obtain yield and carotenoid values inferior to the ones reached by other non conventional extraction procedures (maceration with hexane, hexane:isopropanol, acetone, ethanol; Soxhlet with: hexane, hexane:isopropanol, isopropanol, acetone; and ultrasound with ethanol – Table 5.2). The results from Table 5.2 show the importance of the optimization of the extraction techniques to achieve the maximum TCC value. Furthermore, because of the considerable quality of the extracts (high TCC values) obtained by the extraction methods listed in Table 5.2, we suggest that pink shrimp residue is a suitable raw material to obtain valuable by-products.

Evaluating the results from Table 5.2 we detect that Soxhlet method shows higher yield values compared to maceration, for the same solvent applied. As observed by Mezzomo et al. (2010), the high temperature, the solvent recycle and the solvent/solute interactions, detected in Soxhlet method contributed to the highest solubilization of components from the raw material. Also, the use of solvent in its boiling temperature reduces its viscosity and surface tension, allowing the solvent to reach easier the soluble substances inside the solid matrix (MARKOM et al., 2007).

Maceration procedure using ethanol and isopropanol (Table 5.2) shows extraction yield comparable to conventional method using the

Table 5.2 Extraction yield (EY) and total carotenoid content (TCC) of extracts from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) waste obtained according to extraction technique and solvent.

Technique-solvent ¹	Solvent/raw material ratio (mL/g)	Extraction time (h)	Solvent polarity index ²	EY (w/w %, d.b.) ^{3,4}	TCC ($\mu\text{g/g}_{\text{extract}}$) ³
MAC-Hx	4	120.00	0.00	2 ± 1 ^d	188 ± 5 ^b
MAC-HxIPA	4	120.00	1.95	9.4 ± 0.2 ^c	154.3 ± 0.5 ^c
MAC-IPA	4	120.00	3.90	18 ± 1 ^b	26 ± 1 ^g
MAC-Ac	4	120.00	5.10	4 ± 1 ^{cd}	253 ± 7 ^a
MAC-EtOH	4	120.00	5.20	23.3 ± 0.6 ^b	87 ± 3 ^e
SOX-Hx	30	8.00	0.00	19 ± 2 ^b	35.2 ± 0.1 ^f
SOX-HxIPA	30	8.00	1.95	11 ± 1 ^b	198 ± 3 ^b
SOX-IPA	30	8.00	3.90	22.5 ± 0.4 ^b	78 ± 7 ^c
SOX-Ac	30	8.00	5.10	20 ± 2 ^b	97 ± 2 ^{de}
SOX-EtOH	30	8.00	5.20	68 ± 6 ^a	25.6 ± 0.5 ^g
UE-EtOH	30	0.17	5.20	18.0 ± 0.7 ^b	38 ± 2 ^f
OilH-Sunflower	4	2.00	Null	32 ± 2 (x10 ⁻⁴) ^{β,c}	4.5 ± 0.2 ^{7,h}
OilH-Soy	4	2.00	Null	25.15 ± 0.05 (x10 ⁻⁴) ^{γ,e}	3.87 ± 0.04 ^{δ,h}
OilC-Sunflower	4	2.00	Null	36.4 ± 0.6 (x10 ⁻⁴) ^{β,e}	5.18 ± 0.09 ^{β,h}
OilC-Soy	4	2.00	Null	44 ± 4 (x10 ⁻⁴) ^{α,c}	6.7 ± 0.6 ^{α,h}

¹MAC = Maceration, SOX = Soxhlet extraction, UE = ultrasound, OilC = extraction with cold oil, OilH = extraction with hot oil, Hx = hexane, HxIPA = hexane + isopropanol (50:50), IPA = isopropanol, EtOH = ethanol, Ac = acetone; ²BYERS, 2009; ³Same superscript letter on same column indicate no significant difference (p < 0.05); ⁴In the case of OilH and OilC extractions, the extraction yields are referred to the pigments (carotenoids) extraction yield.

same pre-treatment (Table 5.1). Moreover, maceration does not require the use of heating system during extraction and applies low amount of solvent ($4 \text{ mL/g}_{\text{raw material}}$), although high extraction times are needed. According to the literature, xanthophylls such as astaxanthin, which contain oxygenated groups in their β -ionone rings, are adequately extracted by polar solvents like ethanol and isopropanol (MEYERS and BLIGH, 1981; GOUVEIA et al., 2007; GU et al., 2008).

The sample obtained by ultrasound with ethanol showed satisfactory extraction yield, similar to data obtained by Soxhlet with hexane, isopropanol and acetone, and maceration with ethanol and isopropanol. Ultrasound can facilitate swelling and hydration of the shrimp waste, allowing an enlargement in the pores present on matrix cells from the raw material. This effect improves the diffusion process, enhancing the mass transfer of soluble constituents from solid material to solvent phase, especially by diffusion (MACÍAS-SANCHEZ et al., 2009; BENELLI et al., 2010). Additionally, ultrasound method can use moderate extraction temperatures and very low process time such as the 10 min applied in the present work, which is equivalent to 1/48 and 1/720 times lower than Soxhlet and maceration processes (Table 5.2), respectively.

Extractions using vegetal oil as solvent resulted in low yields for all conditions applied (type of vegetable oil and process temperature), where no significant difference ($p < 0.05$) was detected among data, when compared to other techniques (maceration, Soxhlet and ultrasound extraction). Despite that, vegetable oils can be used in a combination with other solvents to improve the extract quality, and the knowledge of the extracting conditions is valuable. Therefore, we applied statistical analysis among the results for oily solvents (OilC and OilH), searching for process optimization. The results, showed in Table 5.2 (superscript Greek letters), indicate that soy oil was better than sunflower at room temperature, while the opposite was detected at higher temperature. The increase in temperature with soy oil as solvent also reduced significantly the carotenoids extraction yield (from $44 \pm 4 \times 10^{-4}$ to $25.15 \pm 0.05 \times 10^{-4} \%$). This behavior probably occurred because carotenoids are heat-sensitive compounds that can be degraded at high temperatures.

5.3.2.2 Total carotenoid content

The TCC results for the different extraction systems are shown in Table 5.2. Comparing these data with the result obtained by the classical extraction method (Table 5.1) for the sample heated/dried/milled ($29.2 \pm 0.3 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$) we observe that the methods listed in Table 5.2 presented higher TCC values, except for the sample obtained by Soxhlet with ethanol ($25.6 \pm 0.5 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$), by maceration with isopropanol ($26 \pm 1 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$) and by ultrasound samples. These results indicate that the optimization of the carotenoid recovery from the shrimp processing waste is feasible by selecting the suitable extraction technique.

The highest TCC observed was $253 \pm 7 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$, for the sample obtained by maceration using acetone, followed by Soxhlet with hexane:isopropanol ($198 \pm 3 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$). Samples obtained by maceration with hexane:isopropanol and by Soxhlet with acetone, with isopropanol and with ethanol also presented satisfactory TCC values (Table 5.2) when compared to classical extraction method (Table 5.1). Actually, astaxanthin can be successfully extracted by alcohols and acetone as solvents due to their high polarity, justifying the results from the present study and suggesting that acetone is the best solvent for carotenoid extraction from *P. brasiliensis* and *P. paulensis* residue.

Comparing the extraction techniques in terms of total carotenoid content, maceration with acetone was statistically superior to other methods, probably because the non-requirement of a heating system during extraction, which avoids the carotenoids thermal degradation, and the high contact time between solvent and raw material. Subsequently, Soxhlet also presented satisfactory TCC, probably due to the high diffusion and solubilization power promoted by this technique, resulting in a good amount of carotenoids extracted from the raw material (MEZZOMO et al., 2010). This behavior can be observed when comparing the extraction methods maceration (low temperature process) and Soxhlet (high temperature process) by means of the same solvents (hexane, ethanol and acetone). The results from Table 5.2 show that, in general, maceration samples presented superior TCC values compared to Soxhlet samples, except when isopropanol was used as solvent (pure or in mixture), probably because of the solute/solvent interactions and to the association between carotenoids and macro elements from the shrimp residue.

The ultrasound method is also a promising alternative for processing shrimp residues with no heating application, because ultrasound allows good extraction yield, although the TCC was low. Therefore, the results from Table 5.2 suggest that the ultrasound method is adequate for the extraction of different groups of compounds (instead of carotenoids), such as lipids and proteins. Alternatively, the carotenoid extraction can be optimized by increasing the extraction time or using other solvent, such as acetone or hexane:isopropanol mixture.

Extraction with vegetal oils as solvent presented the lowest carotenoid content values, contrasted to other techniques (Table 5.2). Additionally, considering only the samples obtained by vegetable oil extraction we detect: (1) samples obtained by hot vegetal oils have TCC values statistically lower than samples obtained by cold oils, probably due to the low stability of carotenoids in high temperatures; (2) considering the cold oil results, soy oil produced the highest TCC compared to sunflower oil. For instance, the presence of the thermo sensible unsaturated fatty acids, such as linolenic acid from the soy oil (ANTHONISEN et al., 2007), enhance the interactions among the components presented in the shrimp residue, improving the carotenoid extraction. Besides the low carotenoid content obtained by vegetable oils, in defense of these solvents are the protection against oxidation, the selectivity enhancement and the supply of energy for food products (MEYERS and BLIGH, 1981; CHEN and MEYERS, 1982; SHAHIDI and SYNOWIECKI, 1991; GOUVEIA et al., 2007).

5.3.2.3 Carotenoid profile

The carotenoid profile determined by HPLC, for the extract samples from the shrimp residue, obtained by the various methods (Soxhlet, maceration, ultrasound, extraction with cold and hot oil) and solvents (hexane, hexane:isopropanol, isopropanol, acetone, ethanol, sunflower and soy oils) are presented in Table 5.3.

The results from Table 5.3 show that astaxanthins in free and esterified forms are the most abundant components among the carotenoids (total carotenoids content) present in the shrimp residue extracts, independently of the extraction technique applied. The astaxanthin in its free form is unstable and extremely sensitive to factors such as light, oxygen, acidity, and heat (GUERIN et al., 2003). Under

Table 5.3 Carotenoid profile for pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) waste extracts from different extraction procedures.

Technique-solvent ³	Carotenoid contents ($\mu\text{g/g}_{\text{extract}}$) ^{1,2}						
	Esterified astaxanthin	Free astaxanthin	β -cryptoxanthin	α -carotene	<i>trans</i> - β -carotene	<i>cis</i> - β -carotene	
MAC-Hx	138 \pm 3 ^c	nd	49 \pm 1 ^a	0.61 \pm 0.04 ^b	0.6 \pm 0.2 ^a	nd	nd
MAC-HxIPA	154.2 \pm 0.5 ^b	nd	nd	nd	nd	0.015 \pm 0.002 ^b	nd
MAC-IPA	23.8 \pm 0.6 ^g	nd	2.1 \pm 0.7 ^b	0.009 \pm 0.005 ^a	0.009 \pm 0.005 ^b	nd	nd
MAC-Ac	121 \pm 4 ^c	131 \pm 2 ^a	nd	Nd	nd	nd	nd
MAC-EtOH	79 \pm 3 ^e	nd	4.2 \pm 0.5 ^b	Nd	nd	nd	nd
SOX-Hx	30.5 \pm 0.2 ^{fg}	nd	4.8 \pm 0.1 ^b	Nd	nd	nd	nd
SOX-HxIPA	197 \pm 3 ^a	nd	nd	nd	nd	0.28 \pm 0.05 ^a	nd
SOX-IPA	78 \pm 7 ^e	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SOX-Ac	97 \pm 2 ^d	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SOX-EtOH	2.6 \pm 0.2 ^h	23.0 \pm 0.7 ^b	nd	nd	nd	nd	nd
UE-EtOH	38 \pm 2 ^f	nd	0.65 \pm 0.08 ^c	nd	nd	nd	nd
OilH-Sunflower	0.9 \pm 0.4 ^h	4.3 \pm 0.5 ^c	nd	nd	nd	nd	nd
OilH-Soy	1.9 \pm 0.1 ^h	4.9 \pm 0.8 ^c	nd	nd	nd	nd	nd
OilC-Sunflower	0.67 \pm 0.05 ^h	3.9 \pm 0.1 ^c	nd	nd	nd	nd	nd
OilC-Soy	0.468 \pm 0.003 ^h	3.40 \pm 0.05 ^c	nd	nd	nd	nd	nd

¹Same superscript letter on same column indicate no significant difference ($p < 0.05$); ²nd = not-detected; ³MAC = Maceration, SOX = Soxhlet extraction, UE = ultrasound, OilC = extraction with cold oil, OilH = extraction with hot oil, Hx = hexane, HxIPA = hexane + isopropanol (50:50), IPA = isopropanol, EtOH = ethanol, Ac = acetone.

these conditions, the free component is very susceptible to a variety of oxidative conversions, degradation, and isomerization processes. Nevertheless, because of the high possibility to link with free radicals, the astaxanthin in its free form also presents high antioxidant power (STOREBAKKEN et al., 2004).

The concentration of astaxanthin in the free form decreased progressively for the extract samples obtained by: maceration with acetone ($131 \pm 2 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$), Soxhlet with ethanol ($23.0 \pm 0.7 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$), extraction with hot oils (from 0.9 ± 0.4 to $1.9 \pm 0.1 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$), and extraction with cold oils (from 0.468 ± 0.003 to $0.67 \pm 0.05 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$). These results were found probably because astaxanthin in free form has lower molecular chain compared to the esterified form, especially when linked to fatty acids, resulting in a better extraction performance for more polar solvents. These methods also reached high extraction yield values (Table 5.2), and consequently low selectivity, i.e., allowed the extraction of chemically distinct compounds (besides carotenoids).

The free astaxanthins can be stabilized by esterification with fatty acids, forming monoesters or diesters of astaxanthin, or with proteins, forming carotene-protein complex (GUERIN et al., 2003). The concentration of astaxanthin in the esterified form is presented in Table 5.3 for the extract samples obtained by the different procedures. The values decreased progressively for the extract samples obtained by Soxhlet with hexane:isopropanol ($197 \pm 3 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$) and by maceration with hexane:isopropanol ($154.2 \pm 0.5 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$) and with pure hexane ($138 \pm 3 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$). These treatments used pure solvent or solvent mixture with low polarity index (from 0.00 to 1.95 - Table 5.2). The polarity of the esterified form of astaxanthin depends on the linked molecule, i.e., proteins enhance the astaxanthin polarity whereas fatty acids reduce it. Therefore, the higher concentration of the esterified form obtained by solvents with low polarity index implies that the pink shrimp extracts are probably mainly esterified by fatty acids (lower polarity), instead of protein (higher polarity). Additionally, the esterified astaxanthin was more efficiently extracted by maceration, probably because of the low temperature and longer contact time between solvent and raw material, compared to other methods.

Besides astaxanthin, secondary metabolite components such as β -cryptoxanthin, α -carotene and β -carotene were also detected in the extracts, mainly for the maceration samples (Table 5.3). The maceration

treatments provide extracts with higher variety and quantity of secondary metabolites, probably due to the longer contact time between solvent and raw material, compared to other methods.

The β -cryptoxanthin is the second most representative carotenoid type detected for the shrimp extracts. The sample obtained by maceration with hexane provided the higher concentration of β -cryptoxanthin ($49 \pm 1 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$), followed by Soxhlet with hexane ($4.8 \pm 0.1 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$) and maceration with ethanol ($4.2 \pm 0.5 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$). Structurally, β -cryptoxanthin is closely related to β -carotene, differing only by the addition of a hydroxyl group to one of the β -ionone ring. Because of its chemical structure, β -cryptoxanthin has antioxidant properties, preventing free radical damage to cells and DNA and some pro-vitamin A activity (LIAN et al., 2006). Recent findings of an inverse association between β -cryptoxanthin and lung cancer risk in epidemiological studies suggest that β -cryptoxanthin could potentially acts as a chemo preventive agent against lung cancer (LORENZO et al., 2009). Due to the importance of β -cryptoxanthin properties, its high amount in extract obtained by maceration with hexane suggests its potential use as a bioactive product.

The component α -carotene is a primary form of carotene differing from β -carotene by the position of a double bond in the aromatic ring. This carotenoid has shown suppressor growth activity of tumors and cancers, by means of paralyzing the cellular multiplication (FOX et al., 1970). In the present work, α -carotene was detected in low concentrations only for the sample obtained by maceration with hexane and with hexane:isopropanol (Table 5.3).

The β -carotene is a natural pigment with a wide variety of market applications, such as food coloring and antioxidant agent, precursor of vitamin A (retinol) in food and animal feed, and additive to cosmetics and to multivitamin preparations. Moreover, the biological potential depends on the predominance of the *cis*-isomer of β -carotene, which is more efficient in protecting against oxidative damage than the *trans*-isomer (JIMENEZ and PICK, 1993). The results from Table 5.3 shows that *cis*- β -carotene was only detected in samples obtained by maceration and Soxhlet methods using solvent mixture of hexane and isopropanol.

Considering the total astaxanthin content (free and esterified forms), the results from Table 5.3 inform that maceration was the most adequate

method and acetone was the best solvent to extract astaxanthin from pink shrimp residue. The ultrasound method was not efficient for astaxanthin extraction, probably because of the low contact time between solvent and raw material, and also due to the use of ethanol, a solvent with low selectivity to astaxanthin. As for TCC results, the extraction with vegetal oils presented the lowest total value (Table 5.2). On the other hand, this method provided extracts enriched in astaxanthin among the identified carotenoids, which suggests a highly selective procedure, although it is necessary to optimize the yield of the extraction method.

Furthermore, the higher concentration of the esterified astaxanthin (Table 5.3), contrasted to the fact that the free form is biologically more active, advice for the necessity of the samples hydrolysis to release the free astaxanthin (BUENO-SOLANO and LÓPEZ-CERVANTES, 2009).

Complementarily, there is a lack of studies about carotenoid profile of shrimp residues, particularly *Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*, mostly related to the astaxanthin content in the lipid fraction. Therefore, in order to compare our results with literature data, we considered information related to shrimp and other marine species. The highest astaxanthin concentration (Table 5.3) was obtained by maceration with acetone ($252 \pm 6 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$), a value superior to the one obtained by Sachindra et al. (2005), for head and carapace Indian shrimp (from 35.8 to 153.1 $\mu\text{g/g}$), and by Omara-Awala et al. (1985), for crawfish puree (123 $\mu\text{g/g}_{\text{lipid}}$). Also, our results (Table 5.3) were similar to the ones obtained by Pacheco et al. (2009) for shrimp (*Litopenaeus* sp.) residue (280 $\mu\text{g/g}_{\text{silage}}$). The variation was probably caused by differences in the environmental conditions, species, astaxanthin quantification methods, and other variables like particles size, temperature, moisture content and residue/solvent ratio.

The most productive extraction procedure was defined by the astaxanthin yield (process yield \times astaxanthin content). The results for the different methods studied, compared to the standard sample (heated/dried/milled extract obtained by the conventional method of carotenoid extraction – Table 5.1) are presented in Figure 5.1 in terms of $\mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}$ of dried raw material (RM).

The data from Figure 5.1 show that: Soxhlet with hexane:isopropanol and with acetone reached the highest astaxanthin yields (21 ± 1 and $20 \pm 2 \mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}$ RM, respectively), followed by

maceration with ethanol and Soxhlet with isopropanol and with ethanol (18.3 ± 0.6 , 17 ± 1 and 17 ± 1 $\mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}_{\text{RM}}$, respectively). The good performance in terms of astaxanthin yield obtained by Soxhlet with ethanol was probably caused by the higher extraction yield of this method (68 % w/w, d.b.), and not to the relative content of astaxanthin ($25.2 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{extract}}$), unlike the extract obtained by Soxhlet with hexane:isopropanol, which the high astaxanthin content ($197 \pm 3 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{extract}}$) was a result from a more selective extract. Therefore, Soxhlet with hexane:isopropanol could represent a viable and interesting choice to obtain astaxanthin enriched extracts from pink shrimp residue, with application in the pharmaceutical and food formulations. Additionally, a complete economical analysis is necessary to provide an industrial application for each extraction technique, as observed and studied by Mezzomo et al. (2010).

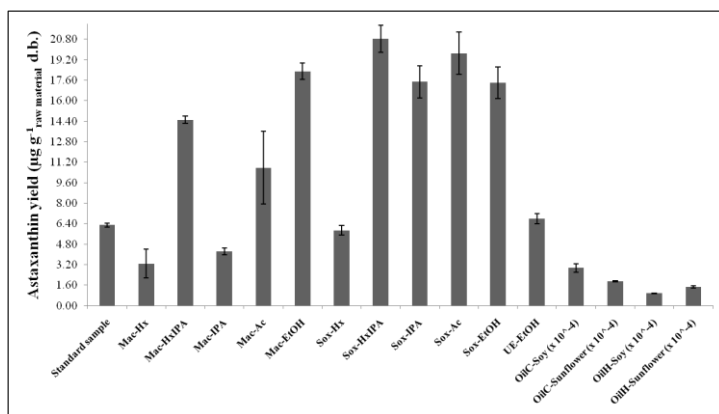


Figure 5.1 The astaxanthin yield from the shrimp residue extracts obtained by different methods (MAC = Maceration; SOX = Soxhlet extraction; HxIPA = hexane:isopropanol; Ac = acetone; EtOH = ethanol; IPA = isopropanol) and by the standard sample (heated/dried/milled pre-treatment and conventional technique of carotenoid extraction).

Finally, the high extraction yield values allied with low astaxanthin yield, for some extracts from pink shrimp residue, indicates that other components, besides carotenoids, are present in the samples. This

behavior advises further chemical investigation of the extract samples. Therefore, a complementary study was performed by UV-Visible scanning spectrophotometry and vibrational infrared spectroscopy (FTIR), which can provide a better evaluation of the chemical composition of the extracts.

5.3.2.4 UV-Vis scanning and Infrared spectroscopy (FTIR)

The UV-Vis spectra (200–750 nm) of the shrimp extracts show a different chemical profile according to the extraction procedure used to obtain the samples investigated (Figure 5.2). According to Figure 5.2, the sample obtained by maceration with hexane presented two main bands: one at 280-300 nm, characterizing phenolic compounds, especially flavonoids; and other at 430-480 nm, typically illustrating the occurrence of carotenoids (HARBORNE, 1976). Maceration and Soxhlet with ethanol produced extracts with a large group of components detected between 300 and 750 nm, which suggest the presence of flavonoids, carotenoids, phenolic compounds, among others. Ultrasound with ethanol showed maximum absorbances in the visible range (from 300 to 500 nm – Figure 5.2), inferring the presence of flavonoid-like compounds, besides carotenoids (HARBORNE, 1976). The extract obtained by cold sunflower oil showed the highest absorbance at 280-300 nm, characteristic of flavonoids (anthocyanins), differently from the sample obtained by hot soy oil, which presented the highest band intensity at 400-480 nm, suggesting that the soy oil, in comparison with sunflower oil, promoted highest carotenoid extraction (Figure 5.2). Finally, maceration with acetone showed maximum absorbances with high intensity at 300 to 350 nm, also inferring the presence of flavonoid-like compounds. The probable presence of these components in the extracts, especially flavonoids, can be attributed to the content of the shrimp head, mainly formed by the digestive system of the animal, contributing to the presence of compounds from animal feed like marine plants and algae. Therefore, the UV-Vis spectrum spectrophotometry confirmed the importance of the extracts, suggesting the presence of components with interesting bioactive properties, such as flavonoids. In this context, the spectrophotometric approach herein described is an interesting contribution to detect the occurrence of non-

carotenoid compounds in the residual biomass in study, i.e., in quality control process of the extracts.

Furthermore, the infrared spectroscopy was performed in order to provide more information regarding the extract composition, necessary for the industrial application of the extracts. Because the extracts obtained by maceration with acetone and with ethanol showed the largest difference in the UV-Vis profile, these samples were selected for the FTIR qualitative analysis. The results, present in Figure 5.3, indicate a similar qualitative spectral profile for both samples, except for small differences at the range between 1800 and 1300 cm^{-1} , indicating comparable composition.

The sample obtained by maceration with ethanol showed the following stronger bands: at 2954, 2924, and 2854 cm^{-1} , typical for alkyl group from proteins; at 1738 cm^{-1} , relative to esters of fatty acids; at 1583 cm^{-1} , that can be related to aromatic compounds such as primary amines; and at 1467, 1406 and 1238 cm^{-1} , which are characteristic of aromatic compounds or carboxylic acids, such as phenolic compounds (BARBOSA, 2007).

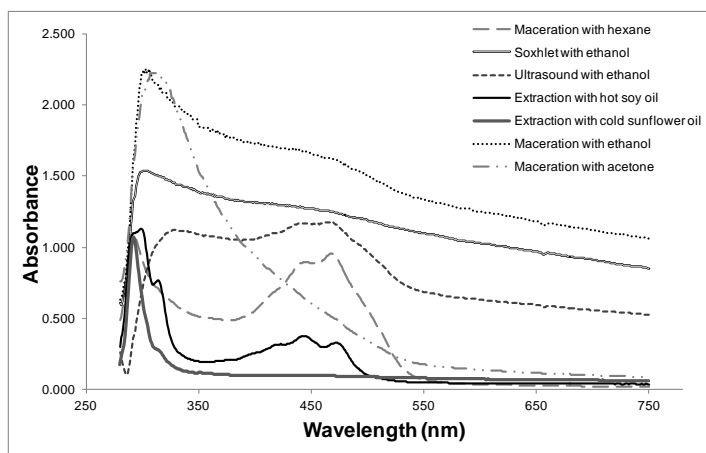


Figure 5.2 UV-Vis spectra (200–750 nm) of the shrimp extracts according to the extraction procedure used to obtain the samples

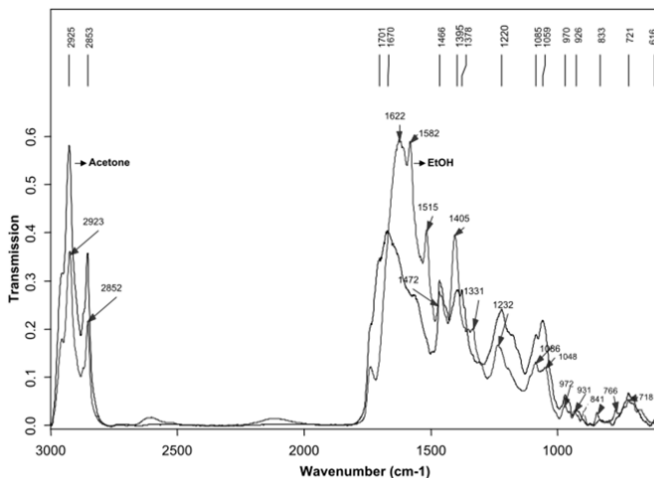


Figure 5.3 FTIR qualitative analysis of the shrimp extracts obtained by maceration with ethanol and acetone

The other extract (maceration with acetone) also contains the same intense bands at 2926 and 2854 cm^{-1} , characteristic from the presence of proteins. Additional strong bands were detected at: 1701 and 1670 cm^{-1} , characteristic of carbonyl and carboxylic acids like proteins and phenolic acids; 1466, 1395, and 1378 cm^{-1} , typical from aromatic compounds, aliphatic amines and carboxylic acids. Minor signals were detected at 2601 and 2118 cm^{-1} , most likely also related to protein components (BARBOSA, 2007).

Similarly to the UV-Vis scanning spectrophotometry, the FTIR results revealed that the shrimp residue extracts present more than carotenoids in their composition, since typical signals for proteins, fatty acids, and phenolic compounds were detected. Such results might be explained by the fact that shrimp waste, composed mainly by head and carapace, contains residues of shrimp meat (BABU et al., 2008).

5.4 Conclusions

The carotenoid extraction from *P. brasiliensis* and *P. paulensis* waste by different techniques and pre-treatments showed the feasibility of this residual biomass as a rich source of carotenoids of human health interest. The industrial application of these methods is technically viable

depending on the astaxanthin purity of extracts. The best raw material pre-treatment, in terms of yield and total carotenoid content, was obtained by the combination of the procedures heat treatment, drying, and milling of the shrimp residues. From the studied extraction techniques, the best solvents for carotenoid extraction were acetone and hexane:isopropanol mixture, which promoted high carotenoid content, particularly using the maceration method. Cold oil extraction can be a good alternative to selectively extract astaxanthin and protect the extract, although process optimization is required to enhance the extraction yield. The UV-Vis spectrum indicated the presence of phenolics, carotenoids, and flavonoids, whereas FTIR analysis revealed the occurrence of proteins, fatty acids, and phenolics, mainly due to the wide composition variety of the shrimp diet. The identified composition of the extracts suggests their high potential for applications in food or pharmaceutical industries.

5.5 References

- ALMEIDA, P. P.; MEZZOMO, N; FERREIRA, S. R. S. Extraction of *Mentha spicata* L. volatile compounds: Evaluation of process parameters and extract composition. **Food and Bioprocess Technology** (Online FirstTM), 2010.
- ANTHONISEN, D. G.; SILVA, S. D. A.; CUNHA JUNIOR, A. Perfil de ácidos graxos de óleos vegetais com potencial para a produção de biodiesel. In: Simpósio Estadual de Agroenergia - Reunião Técnica Anual de Agroenergia-RS, 2007.
- A.O.A.C. Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. 11th ed. Washington. D.C. 1141, 1990.
- BABU, C. M.; CHAKRABARTI, R. SAMBASIVARAO, K. R. S. Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. **LWT**, v. 41, p. 227-235, 2008.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 189 p, 2007.
- BENELLI P.; RIEHL C. A. S.; SMÂNIA Jr, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132-139, 2010.
- BUENO-SOLANO C.; LÓPEZ-CERVANTES J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO-GARCÍA R.; ADAN-BANTE N. P.; SÁNCHEZ-MACHADO D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, 112(3), 671-675, 2009.
- BYERS, J. A. Catálogo Phenomenex. Available in: <http://www.phenomenex.com/phen/Doc/z366.pdf>, 2009.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413-8420, 2008.

CHEN, H. M.; MEYERS, S. Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 30, p. 469-473, 1982.

FAMINO, A. O.; ODUGUWA, O. O.; ONIFADE, A. O.; OLOTUNDE, T. O. Protein quality of shrimp-waste meal. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 1, p. 185-188, 2000.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. FISHSTAT, Rome, 2010.

FOOD AND DRUG REGULATION. Available in: <http://laws.justice.gc.ca/en/F-27/C.R.C.-c.870/124366.html#rid-12437>, Department of justice, Canada, 2005.

FOX, D. L.; MCBETH, J. W.; MACKINNEY, G. Some dietary carotenoids and blood-carotenoid levels in flamingos—II. γ -carotene and α -carotene consumed by the American flamingo. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 36, n. 2, p. 253-262, 1970.

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

GOUVEIA L.; NOVRE, B. P.; MARCELO, F. M.; MREJEN, D.; CARDOSO, M. T.; PALAVRA, A. F.; MENDES, R. L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. **Food Chemistry**, v. 101, p. 717-723, 2007.

GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y.; CHEN, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT**, v. 41, p. 1082–1088, 2008.

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.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. Chapman and Hall, 2 ed, 288 p, 1976.

HEU, M.-S.; KIM, J.-S.; SHAHIDI, F. Components and nutritional quality of shrimp processing by-products. **Food Chemistry**, v. 82, n. 2, p. 235-242, 2003.

HORNERO-MÉNDEZ, D.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of heat treatment and addition of oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 407– 412, 2007.

HUANG, G.; ZEN, Z.; JUNG, J. Separation of Iron-Binding Peptides from Shrimp Processing By-products Hydrolysates. **Food and Bioprocess Technology** (Online FirstTM)

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação**. Brasília, 2008.

JIMENEZ, C.; PICK, U. Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. **Plant Physiology**, v. 101, p. 385–390, 1993.

- KAISER, P.; SURMANN, P.; VALLENTIN, G.; FUHRMANN, H. A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. **Journal of Microbiology Methods**, v. 70, p. 142–149, 2007.
- KUHNEN, S.; LEMOSA, P. M. M.; CAMPESTRINI, L. H.; OGLIARIA, J. B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 284–290, 2009.
- LIAN, F.; HU, K.; RUSSELL, R. M.; WANG, X. β -Cryptoxanthin suppresses the growth of immortalized human bronchial epithelial cells and non-small-cell lung cancer cells and up-regulates retinoic acid receptor b expression. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2084–2089, 2006.
- LÓPEZ, M.; ARCE, L.; GARRIDO, J.; RÍOS, O.; VALCÁRCEL, M. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. **Talanta**, v. 64, p. 726–731, 2004.
- LORENZO, Y.; AZQUETA, A.; LUNA, L.; BONILLA, F.; DOMÍGUEZ, G.; COLLINS, A. R. The carotenoid b-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 308–314, 2009.
- MACÍAS-SANCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; LA OSSA, E. M.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O., 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948–952, 2009.
- MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H.; JAHIM, J. M. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487–496, 2007.
- MEYERS, S. P.; BLIGH, D. Characterization of Astaxanthin Pigments from Heat-Processed Crawfish Waste. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 505–508, 1981.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10–16, 2009.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Economical viability of SFE from peach almond, spearmint and marigold. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 473–479, 2011.
- MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5622–5632, 2010.
- OMARA-ALWALA, T. R.; CHEN, H. M.; ITO, Y.; SIMPSON, K. L.; MEYERS, S. P. Carotenoid pigment and fatty acid analyses of crawfish oil extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 260–263, 1985.
- PACHECO, N.; GARNICA-GONZÁLEZ, M.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, J. Y.; FLORES-ALBINO, B.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E.; SHIRAI, K. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2849–2854, 2009.

PERDIGÃO, N. B.; VASCONCELOS, F. C.; CINTRA, I. H. A.; OGAWA, M. Extração de carotenóides de carapaças de crustáceos em óleo. **Boletim Técnico Científico da CEPENE**, v. 3, n. 1, p. 234–246, 1995.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 85, 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.

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

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoectes opilio*) and Shrimp (*Pandalus borealis*) Processing Discards. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 1527–1532, 1991.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 299p, 1979.

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

STOREBAKKEN, T.; SORENSEN, M.; BJERKENG, B.; HARRIS, J.; MONAHAN, P.; STEPHEN, H. Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feed processing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature. **Aquaculture**, v. 231, p. 489–500, 2004.

TAUNGBODHITHAM, A. K.; JONES, G. P.; WAHLQVIST, M. L.; BRIGGS, D. R. Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 577–584, 1998.

CAPÍTULO 6: EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE CAROTENÓIDES DE RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA

Este capítulo descreve o estudo técnico e econômico da tecnologia supercrítica aplicada à extração de carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa. Este estudo atende aos seguintes objetivos específicos da presente tese (seção 1.2): avaliar a cinética de extração e a modelagem matemática de curvas da ESC de extratos carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa; avaliar as condições operacionais de ESC para a extração de carotenóides do resíduo de processamento de camarão rosa; selecionar e avaliar a aplicação de co-solvente ao CO₂ no processo de ESC do resíduo de camarão rosa; selecionar e avaliar a aplicação de óleo vegetal como co-solvente ao CO₂ supercrítico a fim de produzir um produto oleoso concentrado em carotenóides do resíduo de camarão; realizar a estimativa de custos da ESC do resíduo de processamento de camarão rosa; caracterizar os extratos com relação ao perfil de carotenóides e os perfis espectrais nas faixas do UV-Visível.

A matéria-prima utilizada foi obtida no mercado público de Florianópolis/SC/Brasil e submetida a tratamento térmico, secagem e moagem, de acordo com os resultados do capítulo 5. Foi estudada a cinética de ESC em função da vazão de CO₂ e umidade da matéria-prima, bem como a aplicação de modelos matemáticos e a validação dos parâmetros obtidos através de correlações de números adimensionais. Ainda, diferentes condições de temperatura (313,15 e 333,15 K) e pressão (100-300 bar) foram avaliadas para a ESC, empregando CO₂ puro como solvente. Na condição de 333,15 K/300 bar também foram aplicados modificadores ao CO₂ a 2 % e 5 % (m/m): hexano:isopropanol (50:50), com a finalidade de aumentar o rendimento de extração e de carotenóides; e óleo de girassol, a fim de obter-se um produto oleoso enriquecido de carotenóides. Os resultados foram avaliados quanto ao rendimento de extração, à composição de carotenóides e ao espectro UV-Visível. Por fim, a determinação de custos do processo foi realizada em função do tempo de extração e tipo de extrator utilizado. A eficiência da ESC de carotenóides elevou com o aumento da massa específica do CO₂ e o maior rendimento em astaxantina foi a 333,15 K/300 bar, usando CO₂

puro. A análise de custos do processo sugere o emprego de um equipamento de 2 x 400 L e tempo de 25 min, para um processo mais lucrativo.

A seguir, está apresentado o trabalho completo realizado neste capítulo, no formato de artigo e no idioma inglês, exigido pelos periódicos internacionais de alto impacto da área*.

*Artigo a ser enviado para o periódico *The Journal of Supercritical Fluids*.

Supercritical fluid extraction of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue: Process evaluation, extract composition and cost estimation.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the technical (operational conditions and co-solvent application) and economical viability to concentrate carotenoids through supercritical fluid extraction (SFE) from pink shrimp processing waste. The raw material used was obtained by a local public market (Florianópolis/SC/Brazil) and pretreated using heat treatment, milling and drying. The SFE was evaluated by: process kinetics and modeling, varying moisture content of raw material and CO₂ flow rate; SFE temperature and pressure, using pure CO₂; application of co-solvent (hexane+isopropanol solution, 50:50, and sunflower oil) at concentrations of 2 and 5 %; process costs for industrial application. The extracts were evaluated in terms of extraction yield, total carotenoid content, carotenoid profile, astaxanthin yield and UV-Vis scanning spectrometry. The results indicated that shrimp waste can be used for the concentration of the carotenoid fraction. The SFE was optimized at 13.3 g/min of CO₂ flow rate and at 11.210 % of moisture content. Carotenoid extraction increases with CO₂ specific mass and the highest astaxanthin yield was obtained at 300 bar/333.15 K using pure CO₂. The costs results showed that SFE from shrimp residue using a 2x400 L unit during 25 min is the most lucrative process.

Keywords: co-solvent; total carotenoid content; astaxanthin; Sherwood number; kinetics; modeling.

6.1. Introduction

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2010), the worldwide capture production of marine crustaceans was, in 2009, of five thousand ton. The Brazilian participation in this global production is continuously increasing, particularly in the State of Santa Catarina, which is the largest Brazilian producer of marine fishery. In 2007, the Santa Catarina State (Brazil) increased the crustacean production in 39 %, compared to 2006 (IBAMA, 2008).

Shrimps, when not marketed as "fresh", have been processed to obtain industrial products without head, generating waste as the cephalothorax, or completely stripped products, with the carapace and exoskeleton as residue. The cephalothorax consists of 35 % to 45 % of raw material and exoskeleton around 47 %. Together they represent up to 70 % (w/w) of raw material (SIMPSON and HAARD, 1985). This waste is composed primarily of cephalothorax, exoskeleton, viscera and muscle remnants, and contributes to increase pollution when improperly disposed (FAMINO et al, 2000).

Processing shrimp waste represents a potential source of food ingredients and other additives. Moreover, the use of industrial wastes is not only economic, but also environmentally important. An alternative high added value product is the enriched carotenoid fraction recovered by extraction of shrimp waste, due to its potential demand for food, pharmaceutical and feed industries (OGAWA et al., 2007; MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5).

The extraction technique used to obtain high aggregate value compounds from natural products is crucial for the product quality. There are several conventional procedures for the carotenoid extraction such as maceration (MEYERS and BLIGH, 1981; GILDBERG and STENBERG, 2001; MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5), Soxhlet (MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5), ultrasound (SUN et al., 2006; MACÍAS-SANCHÉZ et al., 2009; MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5), and oil extraction (MEYERS and CHEN, 1985; GILDBERG and STENBERG, 2001; MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5) techniques. Each method presents advantages and disadvantages and the effectiveness of each method depends on the product application and quality. The limitations of conventional processes that reduce the product quality are: high energy costs; elevated solvent use and time consuming; high temperatures, affecting the thermo labile substances; low selectivity; and retention of solvent traces in the solute (CAMPOS et al., 2008; ALMEIDA et al., 2010).

An alternative to conventional techniques of carotenoid extraction is supercritical technology using carbon dioxide (CO₂) for the application in food and pharmaceutical industries (MEIRELES, 2003). Supercritical fluid extraction (SFE) has numerous advantages over conventional techniques (BRUNNER, 1994; MICHIELIN et al., 2005) such as the use of low temperatures and reduced energy consumption, efficiency in

solvent use with recycling possibility, prevention of oxidation reactions and high product quality due to the absence of solvent in solute phase, it is a flexible process due to possibility of continuous adjustment of the solubility and selectivity power of the solvent through the selection of processing parameters.

In spite of the well known advantages of the process such as high quality product, SFE has an economical constraint due to the high investment cost inherent to high pressure processes (MARTÍNEZ et al., 2007). The cost of manufacturing (COM) is influenced by factors that can be divided into three categories: direct costs, fixed costs, and general expenses. Direct costs take into account expenses that depend directly on the production rate, such as raw material, utilities, and operating labor. Fixed cost does not depend directly on the production rate and must be considered even if the operation is interrupted. Examples of items included in this cost are equipment depreciation, taxes and insurance. General expenses are the items necessary to maintain the business and consist of administrative cost, sales expenses, research and development, among others (TURTON et al., 1998; PEREIRA et al., 2007; MEZZOMO et al., 2011b).

This work aimed to evaluate the SFE efficiency in order to concentrate carotenoids from the pink shrimp (*Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*) processing waste. The process efficiency was studied by the effect of the operational conditions and co-solvents used for the extraction on solute characterization, analyzed by determining the carotenoidic and the UV-Visible spectral profiles. In addition, the kinetics and modeling of SFE curves were determined, as well as the process costs.

6.2 Materials and methods

6.2.1 Sample preparation

The raw material consists of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing waste, composed essentially by head, carapace, and tail. The residue was provided by *Peixaria Nelson Santos* (Florianópolis, Santa Catarina, southern Brazil), sited at the local public market. The residue from the shrimp processing was supplied as one sample, representative from the high season production in May, 2010. The raw material pretreatment was selected according to extraction yield and total carotenoid content results showed by Mezzomo et al. (2011a)

(section 5.3.1, chapter 5 of this thesis). The pink shrimp processing waste was submitted to a quick heat treatment by double boiler in water at 373.15 K during 10 min (PERDIGÃO et al., 1995), followed by drying at 333.15 K for 5 or 10 hours in a oven with air circulation (DLSE, DeLeo), according to different final moisture content evaluated in the kinetics assays. Finally, the samples were grounded in a domestic blender (LiqFaz, Wallita) with mass and time predetermined.

6.2.2 Supercritical Fluid Extraction (SFE)

SFE from pink shrimp processing waste was performed in a dynamic extraction unit (ZETZL et al., 2003) (for details, please see section 3.5). A co-solvent pump (Constametric, 3200, EUA), was connected to the extraction line in order to supply the modifier (organic solvent mixture or vegetable oil at high-pressure) at pre-established flow rate, to mix with CO₂ flow before entering the extraction vessel. The extraction procedure (MICHIELIN et al., 2005), consisted of placing a fixed mass of 16 g of pretreated shrimp residue inside the extractor cell to form the particle fixed bed, followed by the control of the process variables (temperature and pressure). The extraction was then performed and the solute collected in amber flasks after 180 min and weighed on an analytical balance (OHAUS, Model AS200S, NJ – USA).

The SFE assays were divided into 3 groups: (a) SFE curves using pure CO₂ and performed at 200 bar and 333.15 K, varying CO₂ flow rate (8.3 and 13.3 g/min) and raw material moisture content (11.21 and 46.30 %) in order to identify the SFE kinetic periods and apply the mathematical mass transfer models declared in section 6.2.3; (b) pure CO₂ assays, using carbon dioxide as solvent and at the conditions of 313.15-333.15 K and 100-300 bar at a constant solvent flow rate of 13.3 ± 0.8 g/min; (c) the co-solvent assays, where hexane:isopropanol solution (50:50, v/v) and sunflower oil (selected according to best extraction results of conventional techniques studied by Mezzomo et al., 2011a – section 5.3.2, chapter 5 of this thesis) were mixed with supercritical CO₂ in concentrations of 2 and 5 % (w/w), considering pump limits of operation and the objective of reducing use of modifiers. This group of assays was performed at 333.15 K and 300 bar and, for the case of organic solvent solution, it was separated from the extract at reduced pressure by evaporating the solvents used in a rotary evaporator (802, Fisatom) by means of a vacuum control and a thermostatic bath

(MQBTZ 99-20, Microquímica). In the case of the vegetal oil, the extraction yield was quantified by the total carotenoid content, as expressed in section 6.2.5.1, and they are referred to the pigments (carotenoids) extraction yield. For the other SFE assays, the extraction yield was determined by the ratio between extract mass produced and raw material mass used for extractions. The SFE process used 99.9 % pure CO₂ delivered at pressure up to 60 bar (White Martins) and for each operating condition the values of solvent specific mass were obtained according to Angus et al. (1976).

6.2.3 Mathematical modeling of SFE curves

The SFE curves of pink shrimp residue were obtained by plotting extraction yield *versus* time to describe the different extraction steps: constant extraction rate (CER), falling extraction rate (FER) and diffusional period. For the kinetic analysis of the extraction procedure the modeling of SFE curves from pink shrimp processing residue was performed using the following models: Sovová (1994), logistic model of Martínez et al. (2003) and the Single Plate model (SSP) of Gaspar et al. (2003). The model equations are extensively described by Kitzberger et al. (2009) and in section 2.6 of this document. The software Mass Transfer (LATESC/UFSC), developed in Delphi 7.0 and with the maximum likelihood method to minimize the sum of the squares of the residues, was used for the logistic and the diffusion models, as described by Correia et al. (2006). The Sovová's model (1994) was applied according to a derivative-free optimization method (POWELL, 2009).

The applied models require additional information such as: (a) particle diameter (d_p) of raw material, determined by scanning electronic microscopy (JSM-63990LV, JEOL); (b) solid specific mass (ρ_s), determined by helium pycnometry (AccuPyc II 1340, Micrometrics); (c) bed diameter and height of the extraction column; (d) SFE bed apparent specific mass (ρ_a), calculated by the ratio between the raw material mass and bed volume; (e) solvent specific mass (ρ_{CO_2}); (f) bed porosity (ϵ), determined by the ratio $(\rho_s - \rho_a)/\rho_s$. Besides that, the application of Sovová's model (1994) also uses the solubility (Y^*) of the extract in the supercritical CO₂ as a function of SFE temperature and pressure. According to previous studies of our research group, the solubility exerts a little influence in the model adjustment, and for its determination it is required a complex study of system phase equilibria.

Then, in the present work, the solubility was obtained according to the estimation procedure described by Danielski et al. (2007), and the result was named “primary solubility”. The primary solubility assays were performed using 16 g of pink shrimp processing residue, 0.9 g/min of Q_{CO_2} and a SFE time of 600 min. The solvent flow rate must be low to assure equilibrium condition or consider that the extractor is sufficiently long in order to provide enough contact time between solvent and solid phases to reach the CO_2 saturation before the SFE bed outlet (for details, please see section 3.5.1).

6.2.4 Validation of mass transfer coefficients by dimensionless correlations

Mathematical models that represent real mass transfer phenomena contain two kinds of uncertainties: a) Model uncertainty, due to a non-exact physical-mathematical description of the system, for instance an oversimplification; b) Parameter uncertainty, resulting from errors from the experimental data employed to estimate the model parameters (FIORI et al., 2007).

In the present study we can enlist some of the most important process parameters, such as the mean value of the particle diameter (grounded raw material), the solute diffusivity in the supercritical fluid, the solid mass transfer coefficient (inside the particles), among others. These properties are determined from the experimental results considering a certain degree of inaccuracy: even if the mathematical model is correct from a physical–mathematical point of view, uncertainty in parameters can affect the model predictions. Therefore, considering the parameters inaccuracy, we proposed a comparative analysis for the most significant parameter in terms of physical meaning, the mass transfer coefficient in the solvent phase (k_{YA}). The values of this parameter were obtained from different SFE curves from this work and were examined through a sensitivity analysis taken at the parameter values by the dimensionless Sherwood (Sh) number, named as experimental Sh (Sh_e), calculated according to equation (3.2) from section 3.5.2.

Three well-established Sh correlations were used to obtain the calculated values for Sherwood numbers and subsequently compared with the experimental ones (Sh_e). The Wakao and Kagui (1982) correlation, presented in equation (3.5) from section 3.5.2, considers

natural and forced convections applied for $3 < Re < 3,000$ and $0.5 < Sc < 10,000$. The Tan et al. (1988) correlation, illustrated in equation (3.6) from section 3.5.2, does not consider natural convection and it was developed for $2 < Re < 40$. The King et al. (1983) correlation, showed in equation (3.7) from section 3.5.2, also consider only the forced convection and it is valid to $2 < Re < 70$ and $2 < Sc < 11$.

6.2.5 Characterization of shrimp residue extracts

6.2.5.1 Carotenoid profile

Shrimp residue extracts obtained by SFE in the pure CO₂ and in the co-solvent assays, as described previously in section 6.2.2, were properly homogenized in *n*-hexane (2 mL) and the resulting solution was centrifuged at 3000g during 5 min. The extracts were analyzed by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC), according to the procedure described by Kuhnen et al. (2009), described extensively in section 3.6.1. The results of HPLC analysis was expressed by the carotenoids concentration, by the total carotenoid content (TCC), obtained from the sum of the amounts from all identified carotenoids, and also by the astaxanthin yield, calculated considering the total extraction yield (results from section 6.3.3) and the astaxanthin content.

6.2.5.2 UV-Visible spectrum

The extracts (20 mg) obtained by all SFE conditions were transferred to amber flasks, homogenized with 10 mL of *n*-hexane and manually agitated. The UV-Visible scanning profile of samples was obtained through an UV-Visible spectrophotometer (U-1800, Hitachi), for a spectral window of 200 to 750 nm, and performed in triplicate.

6.2.6 Statistical Analysis

The results of extraction yield, total carotenoid content, contents of different identified carotenoids, and astaxanthin yield were statistically evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA) using the software Statistica for Windows 6.0 (Statsoft Inc., USA). The significant differences (level of 5 %) were analyzed by the Tukey test.

6.2.7 Cost estimation of industrial SFE

The methodology of Turton et al. (1998), presented by Rosa and Meireles (2005), was used to estimate the COM, which is influenced by a series of factors which can be subdivided into three categories: direct costs, fixed costs, and general expenses. The direct costs take into account expenses that depend directly on the production rate, such as raw materials, utilities and operating labor, among others. The fixed cost does not depend even if the operation is interrupted. In this cost are included the depreciation, taxes and insurance, etc. General expenses are overheads of the plant needed to maintain the business and consist of the administrative cost, sales expenses, and research and development, among others. Then, the COM can be calculated using equation (3.8) from section 3.5.3.

The values of the manufacturing and the specific costs were determined using the software Tecanalysis (ROSA and MEIRELES, 2005). The process costs were determined for: two commercial units with distinct work-volumes capacity (3 x 300 L and 2 x 400 L); SFE times of 25 and 180 min, which represents the constant extraction rate period and total time of extraction, respectively; operational conditions of the SFE assay that presented the best astaxanthin yield in the present study (results presented in section 6.3.5).

6.3 Results and discussion

6.3.1 Kinetics and modeling of SFE from pink shrimp residue

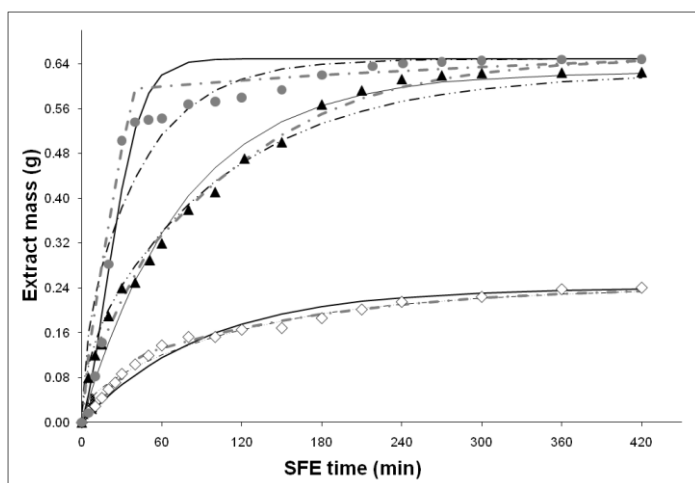
The experimental extraction curves (solute extraction from the pink shrimp residue using supercritical method) obtained for different conditions are presented in Figure 6.1, which also presents the adjusting results using the mass transfer models studied (Logistic model of Martínez et al., 2003; Single plate model of Gaspar et al., 2003; and Mass transfer model of Sovová, 1994). In the same way, the kinetic results from the extraction curves and the modeling parameters of SFE from pink shrimp residue, evaluating effects of CO₂ flow rate (8.3 and 13.3 g/min) and moisture content of raw material (46.30 ± 0.06 % and 11.210 ± 0.005 %) are shown in Table 6.1.

From Figure 6.1 and comparing the SFE curves obtained using the same moisture content of raw material (45.30 %), we observe that the extraction efficiency depends on the CO₂ flow rate, which varied from 8.3 g/min to 13.3 g/min. (curves 1 and 2), resulting in an enhancement

in the total yield efficiency in 160 % at the higher flow rate. This behavior can be also detected by the values of M_{CER} , presented in Table 6.1, which increased from 0.0025 g/min (curve 1) to 0.0089 g/min (curve 2) with the CO_2 flow rate increase (Table 6.1). According to Marrone et al. (1998), the higher solvent availability on the extraction cell promotes superior concentration gradients between solid and solvent, leading to higher mass transfer rates due to convection increase, which is caused by CO_2 instauration. Similar effects of the M_{CER} increasing with the CO_2 flow rate enhancement were observed by Campos et al. (2005) for SFE from marigold flowers, by Weinhold et al. (2008) for SFE from *Polygala cyparissias* and by Mezzomo et al. (2009) for SFE from peach almond. Furthermore, the CER time was reduced from 67 to 31 min when higher CO_2 flow rate (13.3 g/min) was applied in the present work. The combination of the CER time with the value of M_{CER} results in higher yield at the CER period (Figure 6.1 and Table 6.1). According to Mezzomo et al. (2009), the increase in the extraction efficiency at higher CO_2 flow rate is employed due to the higher solvent velocity through the bed, which decreases the thickness of the film that involves the solid particles, reducing the mass transfer resistance. Finally, the beginning of the second period of the SFE curves, the decreasing extraction rate period (FER), is delayed due to the increase in the CER period with the flow rate reduction. As a consequence the t_{FER} value (Table 6.1), increased.

The effect of the raw material moisture content was also observed from the SFE curves and the kinetics parameters, although the effect detected was not as representative as the yield differences achieved by the changes in the CO_2 flow rate. As observed in Figure 6.1, the effect of the moisture content was more evident at the CER period, were we detect that the reduction in the solid water content promoted lower t_{CER} and higher M_{CER} , Y_{CER} , and X_{CER} (at moisture content of 11.210 ± 0.005 %) (Table 6.1). The influence of the raw material moisture content on the extraction efficiency in the CER period occurred mainly because this stage is mostly controlled by the convective mass transfer mechanism between the solvent and the solute, essentially because we considered that, due to the particle reduction (milling), the solute is exposed and covers the raw material particles. According to the result presented in chapter 5 (Mezzomo et al., 2011a) the best raw material pretreatment was the combination of heat

treatment, milling and drying for 5 hour, which allowed the highest carotenoid recovery from shrimp residue by using different conventional extraction systems. Otherwise, in a SFE process the higher water content in the solid matrix promotes lower content of extract covering it and, consequently, the solute concentration gradient and its solubilization are lower. Therefore, in order to obtain higher SFE efficiency from the shrimp residue, the ideal moisture content of raw material was 11.210 ± 0.005 %, which was obtained by increasing the drying time from 5 to 10 hours.



◇ Curve 1) Moisture content of raw material= 46.30 ± 0.06 % and CO_2 flow rate = 8.3 g/min; ▲ Curve 2) Moisture content of raw material = 46.30 ± 0.06 % and CO_2 flow rate = 13.3 g/min; ● Curve 3) Moisture content of raw material = 11.210 ± 0.005 % and CO_2 flow rate = 13.3 g/min; — Logistic model of Martínez et al. (2003); - - - Single plate model of Gaspar et al. (2003); - · - Mass transfer model of Sovová (1994).

Figure 6.1. Experimental and modeled curves of SFE from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue varying moisture content of raw material and CO_2 flow rate

The results discussed above indicate that the moisture content of 11.210 ± 0.005 % and CO_2 flow rate of 13.3 g/min was selected for the subsequent study of the SFE operational parameters (temperature, pressure and co-solvent application), representing the group of pure CO_2 and co-solvent assays, as described in section 6.2.2 from this chapter.

The response aspects evaluated in these extractions were the global extraction yield (X_0) and the characterization attributes (total carotenoid content, carotenoid and UV-Vis profiles). The necessary SFE time to reach the diffusive period of curve 3 (180 min) was used to perform the above mentioned study.

The modeled SFE curves from shrimp residue are also presented in Figure 6.1, as well as Table 6.1 presents the adjustable parameters and mean square error (MSE) of the mathematical models applied. The modeling of extraction processes requires the knowledge of some process variables. The extract primary solubility in supercritical CO_2 , determined at 200 bar and 313.15 K, was $0.0003 \text{ g}_{\text{extract}}/\text{g}_{\text{CO}_2}$. The other SFE parameters used to model the overall curves were: particle diameter of 0.554 cm , ρ_{CO_2} of $0.725 \text{ g}/\text{cm}^3$, ρ_s of $0.762 \pm 0.001 \text{ g}/\text{cm}^3$, ρ_a of $0.64 \pm 0.03 \text{ g}/\text{cm}^3$ and ϵ equal to 0.16 ± 0.04 .

The modeled curves presented in Figure 6.1 showed better performances for Sovová's model, not only in the CER period but also during the FER and the diffusional regions of the overall curves. The best behavior presented by Sovová's model is also presented in Table 6.1 by the lowest values of the mean square error (MSE). Results from Table 6.1 additionally indicated good behavior of the logistic model (MARTÍNEZ et al., 2003) and the SSP model (GASPAR et al., 2003) to represent the overall curves of shrimp residue extract, although Sovová's model presents a stronger physical representation of the mass transfer mechanisms. In addition, Sovová's model considers a vegetable matrix as raw material and in the present work was used an animal product. Then, the good performance of this model suggests that probably the physical description of solute incorporation in the shrimp residue particles is similar to a vegetable structure, where the solute is distributed in broken and intact cells.

For the logistic model, the adjustable parameter t_m corresponds to the time which the extraction rate is maximum and the results from Table 6.1 show negative values for curves 1 and 2. In these cases, the extraction rate is already at its maximum value at the initial instant of the extraction (time zero) (MARTÍNEZ et al., 2003). For curve 3, the initial instant of extraction was at 19 min (Table 6.1).

The SSP model considers that the extraction process is controlled only by diffusion and presents as adjustable parameter the solute diffusivity (D) (GASPAR et al., 2003). Also, this model considers that

Table 6.1. Model coefficients, adjustable parameters, and mean square errors from the modeled curves of SFE from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue.

Curve	1	2	3
Moisture content (%)/CO ₂ flow rate(g/min)	46.30/8.3	46.30/13.3	11.210/13.3
CO ₂ specific mass (g/cm)	0.725	0.725	0.725
<i>t</i> _{CER} (min)	67	31	25
<i>M</i> _{CER} (g/min)	0.0025	0.0089	0.3650
<i>Y</i> _{CER} (g/g)	0.0003	0.0007	0.0274
<i>X</i> _{CER} (%)	0.60	1.20	1.60
<i>t</i> _{FER} (min)	297	206	178
Logistic Model	<i>b</i> _i (min ⁻¹) 0.010835	0.013110	0.080179
	<i>t</i> _{mi} (min) -4064.39	-313.59	19.17
	MSE 0.0002	0.0007	0.0021
Modeling parameters ⁽²⁾	<i>D</i> _m (10 ⁻⁹ m ² /min) 7.2	8.5	20.4
	MSE 0.0002	0.0006	0.0047
	<i>k</i> _{xa} (10 ⁻³ min ⁻¹) 6.01	10.38	2.39
Sovová's Model	<i>k</i> _{ya} (min ⁻¹) 4.88	12.31	14.12
	<i>x</i> _k (g/g) 0.0090	0.0283	0.0064
	MSE (x 10 ⁶) 0.0007	0.0058	0.0646

⁽¹⁾CER = constant extraction rate period; *t*_{CER} = time of CER; *M*_{CER} = mass transfer rate of CER; *Y*_{CER} = solvent phase solute mass ratio at bed outlet in the CER; *X*_{CER} = extraction yield in the CER; *t*_{FER} = time of falling extraction rate period; ⁽²⁾ Logistic model: Martínez et al. (2003); *b*_i = adjustable parameter of logistic model; *t*_{mi} = time of the maximum extraction rate in the logistic model-adjustable parameter; SSP Model: Single Plate Model of Gaspar et al. (2003); *D*_m = diffusivity; Sovová's Model (Sovová, 1994); MSE = medium square error; *k*_{xa} = mass transfer coefficient in the solid phase; *k*_{ya} = mass transfer coefficient in the liquid phase; *x*_k = initial mass of extractable material in intact cells, relative to mass of non-extractable material.

the solid matrix is formed by single plate particles, determined in this work by scanning electronic microscopy analysis, as demonstrated in Figure 6.2, and that probably contributed to the good adjustment of the model. The D values of the present work (Table 6.1) increased mainly with the decrease in the raw material moisture content, but also with the CO₂ flow rate enhancement. The higher moisture content effect on D values is observed because when the moisture content is lower, the solute concentration in the raw material is higher. This fact leads to a higher solute/solvent gradient, improving the diffusive processes. In addition, when more water is present in the solid matrix, the pathway is less free for solvent entry and, then, the solute diffusion is diffculted.

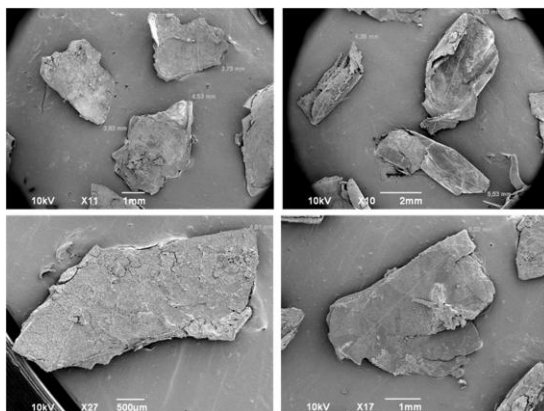


Figure 6.2. Scanning electronic microscopy analysis of particles of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue used in SFE

The k_{ya} values increase with Q_{CO_2} (curves 1 and 2), since this parameter represents the mass transfer coefficient in the fluid phase and as a consequence is affected by the CO₂ velocity. The internal and external mass transfer resistances are evaluated by the values of k_{xa} and k_{ya} . The results from Table 6.1 show that k_{xa} is much lower than k_{ya} for all curves. The solute trapped inside the particles takes longer to cross the solid-fluid interface than the solute located on particle surface (WEINHOLD et al., 2008), reducing the mass transfer coefficient in solid phase. Therefore, lower k_{xa} values indicate that the diffusional mechanism is less representative than the convection on SFE from

shrimp processing residue. The same effects were observed by Campos et al. (2005) in SFE from marigold and by Mezzomo et al. (2009) for peach almond.

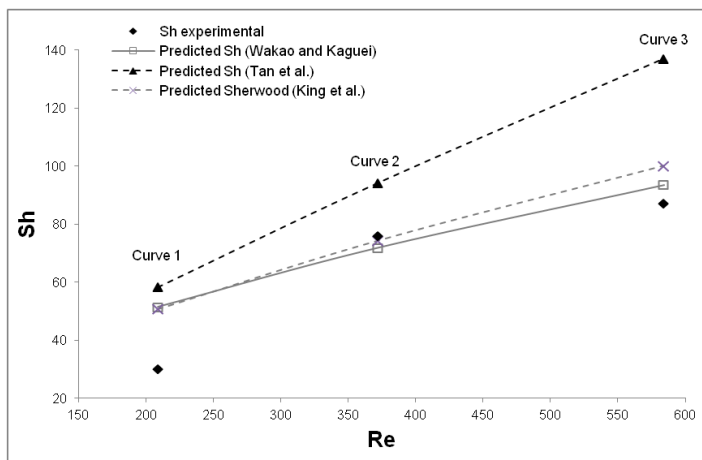
Modeling SFE curves is important for the process optimization and the scale-up analysis, helping the definition of the extractor volume and consequently the extraction yield and time. Moreover, the mathematical mass transfer models can provide information regarding the dominant mass transfer mechanism on supercritical extraction of shrimp residue extract (convective and diffusive phenomena), assisting the definition of methodology for future scale-up studies.

6.3.2 Validation of mass transfer coefficients by dimensionless correlations

The values of the Sh number for the experimental yield curves from SFE of the shrimp residue was calculated using the convective mass transfer coefficient $k_Y a$ obtained by the Sovová's model (section 6.3.1), the diffusivity value ($1.38 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$) and the particle diameter (0.554 cm). In addition, the predicted Sh was determined using correlations involving Re and Sc, described in the literature. For the SFE curves evaluated, the Re results varied from 209.09 to 584.02, characterizing a laminar flow, and Sc was equal to 6.06 for all curves evaluated.

The experimental and predicted Sh results using the correlations of Wakao and Kaguei (1982), King et al. (1983), and Tan et al. (1988) are presented in Figure 6.3. According to the results from Figure 6.3, Wakao and Kaguei (1982) and King et al. (1983) correlations presented the best approximation to experimental data.

The good performance of Wakao and Kaguei (1982) correlation is probably due to the following: a) the equation considers mixed convection (forced and natural) involved on the process; b) it the correlation was developed for liquids located inside a solid matrix, as the physical characteristics of the fatty shrimp residue extract; c) the Re and Sc of SFE from pink shrimp is within the range of application of this correlation, which is from 3 to 3,000 for Re and from 0.5 to 10,000 for Sc. The same successful use of Wakao and Kaguei (1982) model was also observed by Madras et al. (1995), modeling SFE of organics, and by Bertucco et al. (1995) to recover vegetable oils using supercritical solvent.



Curve 1: Moisture content of raw material= 46.30 ± 0.06 % and CO_2 flow rate = 8.3 g/min; Curve 2: Moisture content of raw material = 46.30 ± 0.06 % and CO_2 flow rate = 13.3 g/min; Curve 3: Moisture content of raw material = 11.210 ± 0.005 % and CO_2 flow rate = 13.3 g/min.

Figure 6.3. Experimental and predicted Sherwood numbers (Sh), in function of respective Reynolds numbers (Re), obtained for SFE curves from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*)

Otherwise, the correlation by King et al. (1983) considers only forced convection and therefore implying the high importance of the Re number on the Sh values. The good performance of this model indicates that forced convection is the dominant mechanism involved in the mass transfer of the SFE from pink shrimp residue.

The results obtained by the Tan et al. (1988) correlation overestimated the Sh values, compared to the experimental data, besides the fact that this model was developed specifically for supercritical fluid processes. The bad adjustment to the experimental data was probably caused by the values of the Re number, where the experimental range was outside the range of application of the equation, i.e., from 2 to 40.

Considering low difference between the predicted (Wakao and Kaguel, and King et al. correlations) and the experimental Sherwood values we suggest the high reliability of experimental data, especially related to the k_{ya} . Even so, the observed deviations between experimental and predicted Sh were relevant. This difference is common

when the correlations are applied for materials different from those which originated the equation. Therefore, the next step in this study might be to obtain more SFE curves of pink shrimp residue, in order to achieve a considerable number of experimental Sherwood numbers, making the development of a new feasible correlation. A good correlation for a specific process can be useful to predict the behavior of SFE at other conditions, such as pilot and industrial scales.

6.3.3 Global yield (X_0) of SFE from pink shrimp residue

The global extraction yield of SFE using different operational parameters (pressure, temperature and co-solvent application) is shown in Table 6.2.

Table 6.2. Operational conditions, global yield (X_0) and total carotenoid content (TCC) of extracts obtained by SFE from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue

Temperature (K)	Pressure (bar)	Solvent	ρ_{CO_2} (g/cm ³) ¹	X_0 (% d.b.) ^{2,3}	TCC (µg/g) ²
313.15	100	Pure CO ₂	0.629	1.27 ± 0.07 ^c	12.7 ± 0.5 ^a
333.15	100	Pure CO ₂	0.290	0.50 ± 0.08 ^b	3.48 ± 0.03 ^a
313.15	200	Pure CO ₂	0.840	2.1 ± 0.2 ^d	354 ± 6 ^c
333.15	200	Pure CO ₂	0.725	2.21 ± 0.08 ^d	388 ± 3 ^c
313.15	300	Pure CO ₂	0.910	2.7 ± 0.2 ^e	432 ± 9 ^d
333.15	300	Pure CO ₂	0.830	3.0 ± 0.1 ^f	1223 ± 19 ^e
333.15	300	CO ₂ + 2% Hx:IPA	0.830	4.2 ± 0.2 ^g	23.0 ± 0.9 ^b
333.15	300	CO ₂ + 5% Hx:IPA	0.830	4.3 ± 0.1 ^g	24.2 ± 0.8 ^b
333.15	300	CO ₂ + 2% Sunflower oil	0.830	0.004 ± 0.001 ^a	9.12 ± 0.04 ^a
333.15	300	CO ₂ + 5% Sunflower oil	0.830	0.005 ± 0.002 ^a	9.6 ± 0.4 ^a

¹Same superscript letter on same column indicate no significant difference ($p < 0.05$); ²CO₂ specific mass determined according to Angus et al. (1976); ³The X_0 of SFE with vegetal oil as co-solvent was quantified by the TCC and are referred to the pigments (carotenoids) extraction yield.

Global yield results indicate the amount of extract removed by the solvent, which is related to the solvent power and, therefore, to the

process temperature and pressure. The results for pure CO₂ indicate the maximum yield of 3.0 ± 0.1 % (w/w, d.b.) obtained at 333.15 K/300 bar, with solvent specific mass of $0.830 \text{ g}_{\text{CO}_2}/\text{cm}^3$, while the lowest yield was 0.50 ± 0.08 % (w/w, d.b.) at 333.15 K/100 bar, with solvent specific mass of $0.290 \text{ g}_{\text{CO}_2}/\text{cm}^3$. Those results were higher than those of the conventional maceration method with hexane and similar to the same technique using acetone, evaluated for the same raw material by Mezzomo et al. (2011a) (results from section 5.3.2.1).

The increase in the operational pressure, at constant temperature, resulted in the enhancement of the extraction yield due to the increase in the CO₂ specific mass and consequently in the solvent power. The temperature effect, however, is more complex. At 100 bar, raising extraction temperature produced a decrease in the yield (from 1.27 ± 0.07 % to 0.50 ± 0.08 %), due to the reduction in solvent specific mass which varied from $0.629 \text{ g}_{\text{CO}_2}/\text{cm}^3$, at 313.15 K, to $0.290 \text{ g}_{\text{CO}_2}/\text{cm}^3$, at 333.15 K. On the other hand, at higher pressures (above 200 bar), the increase in the extract temperature promoted an increase in the yield, despite the reduction in solvent specific mass. This behavior was caused by the enhancement in the solute (shrimp residue extract) vapor pressure with the temperature increase, which was more significant than the reduction in the solvent specific mass, increasing consequently the overall extraction yield as discussed by Mezzomo et al. (2010). These opposite effects on the overall extraction yields were responsible for the inversion of the yield isotherms. The crossover pressure for the pseudo-binary system shrimp residue extract/CO₂ is, therefore, identified between 180 and 200 bar, for the set of conditions investigated (Table 6.2). Therefore, at pressures below 180-200 bar, the specific mass effect was dominant, while above this condition the solute vapor pressure was the leading mechanism affecting the extraction process. A similar behavior was also detected by several authors for different solid matrixes (MICHIELIN et al., 2005; KITZBERGER et al., 2009; MEZZOMO et al., 2010; BENELLI et al., 2011). La Fuente et al. (2006) studied the solubility of pure commercial astaxanthin (98 % purity) in supercritical CO₂ at 80-400 bar and 313.15-333.15 K and obtained a crossover pressure of 120 bar, below the pressure found in the present study for shrimp processing residue. This difference was probably caused by the presence of other compounds besides astaxanthin in the shrimp residue that are also extractable by supercritical CO₂ and

interfere in the solute vapor pressure, displacing therefore the crossover pressure.

Since the results of conventional extraction technique obtained by Mezzomo et al. (2011a) (chapter 5, section 5.3.2.3) using a mixture of hexane and isopropanol (50:50) were higher than the other conventional systems and also higher than the SFE results using pure CO₂ of the present work, the mixture hexane:isopropanol was selected as a co-solvent for the supercritical CO₂ and applied at concentrations of 2 and 5 % with the purpose to increase the extract solubility in the solvent mixture (hexane:isopropanol and CO₂). In addition, considering that sunflower oil can be a good alternative to enhance the selectively toward the astaxanthin extraction from the shrimp residue and also protect the extract against the oxidation mechanisms (SHAHIDI and SYNOWIECKI, 1991), it was also applied as co-solvent to supercritical CO₂ at 2 and 5 %. The operational conditions used for the co-solvent assays were those of the highest yield obtained by SFE with pure CO₂ (333.15 K/300 bar) and the SFE yield results of these assays are presented in Table 6.2. The use of 2 % hexane:isopropanol concentration in the supercritical CO₂ provided a statistically significant increase in the extraction yield (from 3.0 ± 0.1 %, with pure CO₂, to 4.2 ± 0.2 %, with 2 % mixture in CO₂), indicating the higher solubilization of compounds with intermediate polarity by the hexane:isopropanol/CO₂ mixture, since these compounds have limited solubility in pure CO₂. Otherwise, when the hexane:isopropanol concentration applied increased from 2 % to 5 %, no significant increase in the extraction yield was detected.

The use of sunflower oil as co-solvent at 2 and 5 % promoted a significant decrease in the carotenoid extraction yield, when compared to the X₀ of same operational conditions with pure CO₂. This behavior is totally expected due to the use of oil as co-solvent produces a different final product than other SFE assays, i.e., an oily product. In addition, the extraction yields of SFE with vegetal oil were quantified by the TCC and they are referred to the pigments (carotenoids) extraction yield. Then, besides the extraction yield of the SFE with sunflower oil as co-solvent were inferior than other SFE assays, the vegetal oil was enhanced with carotenoids from the shrimp residue and can be used in food enrichment.

6.3.4 Total carotenoid content (TCC) of SFE from pink shrimp residue

The TCC results for the different SFE conditions are also shown in Table 6.2. The highest carotenoid content was detected at 300 bar and 333.15 K using pure CO₂ ($1223 \pm 19 \mu\text{g/g}$), while the minimum TCC was observed at 100 bar and 313.15 K ($3.48 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$).

According to the results from Table 6.2, the TCC data increased significantly with the pressure enhancement due to the improvement in the solubility of the carotenoid-enriched extract from the shrimp residue in the CO₂ at higher pressures (MEZZOMO et al., 2012 – chapter 8). Otherwise, no statistical influence of temperature was observed at 100 and 200 bar, while at 300 bar the TCC increased with the temperature raising. When both operational conditions are combined in a unique thermodynamic parameter, the CO₂ specific mass, it was detected that the TCC values strongly increased with solvent density (Table 6.2). This behavior is probably due to the high molecular weight of the astaxanthin which needs higher CO₂ specific mass to conferred higher solubility and better extraction.

Comparing the TCC obtained in this work with the our previous study results for the conventional extraction systems for the same raw material (from 4.5 to 253.0 $\mu\text{g/g}$ - Mezzomo et al., 2011a – see section 5.3.2.2, chapter 5), we observe that SFE at pressures above 200 bar and temperature between 313.15-333.15 K promoted higher carotenoid extraction, i. e., up to 5 times higher TCC than the maximum value observed by Mezzomo et al. (2011a), showed in section 5.3.2.2 of chapter 5 from this thesis. These results indicate that an optimization of the carotenoid recovery from the shrimp processing waste is feasible by using supercritical technology.

The better performance of the SFE with pure CO₂ compared to conventional techniques, such as Soxhlet and maceration methods, and applied for the carotenoid extraction, especially xanthophylls, was also observed by Sun and Temelli (2006) for carrots, Denery et al. (2004) for *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina*, and Careri et al. (1999) for *Spirulina Pacifica* algae.

The application of the mixture hexane:isopropanol to the supercritical CO₂ was not efficient to increase the carotenoid concentration on the shrimp residue extracts. Such result was probably related to the high lipid content of the raw material and also to the high

solubility of the lipid fraction on the above mentioned organic solvent mixture, which probably changed the system selectivity toward the lipid components, reducing the carotenoid fraction on the extract.

The TCC values of extracts obtained using sunflower oil as co-solvent were the lowest compared to other SFE systems. Otherwise, these amounts are higher than those from the conventional oil extraction (4.5-5.2 µg/g), as presented by Mezzomo et al. (2011a), in section 5.3.2.2 of chapter 5. These results show the extraction improvement of oil extraction systems when associated to SFE. Furthermore, the oil extraction presents the advantages of protecting the carotenoids against oxidation and it can be used as energy supply for food products (MEYERS and BLIGH, 1981; SHAHIDI and SYNOWIECKI, 1991).

6.3.5 Carotenoid profile of SFE extracts from pink shrimp residue

The carotenoid profile for the extract samples from the shrimp residue obtained by SFE using different operational conditions of temperature, pressure, co-solvent concentration and type are presented in Table 6.3.

The results from Table 6.3 show that astaxanthins in both free and esterified forms are the most abundant components among the carotenoids from shrimp residue extracts obtained by SFE, independently of the operational variables applied.

Astaxanthin in its free form is unstable and extremely sensitive to factors such as light, oxygen, acidity and heat (GUERIN et al., 2003), which can promote a variety of oxidative conversions, degradation, and isomerization processes in the free component. Nevertheless, because of the high possibility to scavenge free radicals, the astaxanthin in its free form also presents high antioxidant power (STOREBAKKEN et al., 2004).

Free astaxanthins can be stabilized by esterification with fatty acids, forming monoesters or diesters of astaxanthin, or with proteins, forming carotene-protein complex with higher stability and shelf life compared to the free form (GUERIN et al., 2003). The concentration of astaxanthin in the esterified form is presented in Table 6.3 for the extract samples obtained by the different SFE assays. Observing the effects of SFE operational parameters in the esterified astaxanthin content, different behaviors are detected (Table 6.3): a) the esterified astaxanthin values decreased progressively for the extract samples obtained by.

Table 6.3. Carotenoid profile of the pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue extracts obtained by SFE.

Temperature (K)	Pressure (bar)	Technique-solvent ^b	Carotenoid contents (µg/g _{extract}) ^{1,2}					
			Esterified astaxanthin	Free astaxanthin	β-cryptoxanthin	α-carotene	β-carotene	
313.15	100	Pure CO ₂	5.7 ± 0.2 ^b	6.7 ± 0.2 ^c	0.24 ± 0.09 ^a	nd	0.0041 ± 0.002 ^a	
333.15	100	Pure CO ₂	0.96 ± 0.02 ^a	2.522 ± 0.008 ^b	nd	nd	Nd	
313.15	200	Pure CO ₂	294 ± 5 ^f	-	60 ± 2 ^b	nd	Nd	
333.15	200	Pure CO ₂	225 ± 3 ^e	75.15 ± 0.02 ^d	86.6 ± 0.3 ^c	1.95 ± 0.09 ^a	0.25 ± 0.02 ^b	
313.15	300	Pure CO ₂	322 ± 8 ^g	1.5 ± 0.8 ^a	99.7 ± 0.2 ^c	7.35 ± 0.04 ^b	1.1 ± 0.1 ^c	
333.15	300	Pure CO ₂	768 ± 9 ^h	126 ± 4 ^e	309 ± 6 ^d	18.4 ± 0.2 ^c	1.27 ± 0.03 ^c	
333.15	300	CO ₂ + 2% Hx:IPA	23.0 ± 0.9 ^d	nd	Nd	nd	Nd	
333.15	300	CO ₂ + 5% Hx:IPA	27 ± 1 ^d	nd	Nd	nd	nd	
333.15	300	CO ₂ + 2% Sunflower oil	9.12 ± 0.04 ^e	nd	Nd	nd	nd	
333.15	300	CO ₂ + 5% Sunflower oil	12.1 ± 0.5 ^e	nd	Nd	nd	nd	

¹Same superscript letter on same column indicate no significant difference (p < 0.05); ²nd = not-detected.

increasing pressure applied, at constant temperatures; b) at 100 and 200 bar, an enhance on the temperature produced extracts with lower esterified astaxanthin content, c) finally, at 300 bar, when temperature increased from 313.15 to 333.15 K, higher contents of both free and esterified astaxanthin was obtained in the resulting extracts. Temperature and pressure effects can be better detected and explained when observing the solvent specific mass (Table 6.2), which improves the CO₂ solvation power and, then, their values increased progressively with esterified astaxanthin extraction (Table 6.3). In addition, the polarity of the esterified form of astaxanthin depends on the linked molecule, i.e., proteins enhance the astaxanthin polarity whereas fatty acids reduce it. Therefore, besides astaxanthin presents considerable solubility only at high pressures (LA FUENTE et al., 2006), the good performance of supercritical CO₂ is due to the esterified astaxanthin presented in shrimp extracts is probably mainly esterified by fatty acids, which shows high solubility in CO₂ at low pressures (YU et al., 1994)

The extracts obtained by SFE showed a higher variety of carotenoids when higher CO₂ specific mass and no co-solvent were applied (Table 6.3), i. e., at these conditions lower selectivity was achieved. Besides astaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, and β -carotene were also detected in the extracts, mainly at 300 bar, 333.15 K and using pure CO₂ (Table 6.3). The β -cryptoxanthin is the second most representative carotenoid type detected for the shrimp extracts and its concentration increased with pressure and temperature enhancement (Table 6.3). Structurally, β -cryptoxanthin is closely related to β -carotene and because of its chemical structure it has antioxidant properties (LIAN et al., 2006), chemo preventive action against lung cancer (LORENZO et al., 2009).

As for TCC results, the extracts obtained by means of sunflower oil and hexane:isopropanol mixture as co-solvents to the supercritical CO₂ presented low astaxanthin content (Table 6.3). On the other hand, these treatments provided extracts enriched in astaxanthin among the identified carotenoids, which suggests a highly selective procedure.

Furthermore, the higher concentration of the esterified astaxanthin (Table 6.3), contrasted to the fact that the free form is biologically more active, advice for the necessity of the samples hydrolysis to release the free astaxanthin (BUENO-SOLANO et al., 2009).

The highest astaxanthin concentration (free and esterified forms) shown in Table 6.3 was obtained by SFE at 300 bar, 333.15 K using pure CO₂ ($894 \pm 12 \mu\text{g/g}$), a value superior to the that one obtained by Mezzomo et al. (2011a), showed in section 5.3.2.3 of chapter 5, for the same raw material using conventional systems ($252 \pm 6 \mu\text{g/g}_{\text{extract}}$), Sachindra et al. (2005), for head and carapace of Indian shrimp (from 35.8 to $153.1 \mu\text{g/g}$) and by Pacheco et al. (2009) for shrimp (*Litopenaeus* sp.) residue ($280 \mu\text{g/g}_{\text{silage}}$). The higher recovery herein found indicates that pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) is a good source of carotenoids and the SFE using pure CO₂ at 300 bar and 313.15 K a successful technique to concentrate these valuable compounds.

The most effective extraction procedure was defined by the astaxanthin yield (process yield \times astaxanthin content). The astaxanthin yield resulting from the different conditions studied are presented in Figure 6.4 in terms of $\mu\text{g}_{\text{astaxanthin}}/\text{g}$ of dried raw material (RM). Due to the highest extraction yield (Table 6.2) and astaxanthin content (Table 6.3) observed for the extract obtained by SFE at 300 bar and 333.15 K permitted it to reach the highest astaxanthin yield ($27 \pm 1 \mu\text{g/g}_{\text{RM}}$ – Figure 6.4) in this condition, which was statistically superior to all other SFE assays. The best SFE astaxanthin yield of the present work was superior than the best data obtained by Soxhlet extraction method with hexane:isopropanol and with acetone (20 ± 2 and $21 \pm 1 \mu\text{g/g}_{\text{RM}}$, respectively) applied to the extraction of carotenoids from pink shrimp residue, as presented in chapter 5 of this thesis (MEZZOMO et al., 2011a).

Finally, the comparison among the TCC values, the extraction yield data (Table 6.2) and the astaxanthin content results (Figure 6.4) suggests that other components, besides carotenoids, are also present in the samples, which indicates that further chemical investigation is necessary. Therefore, a complementary study was performed by UV-Visible scanning spectrophotometry. Additionally, a complete economical analysis is necessary to provide an industrial application for the SFE procedure, as observed and studied by Mezzomo et al. (2011b).

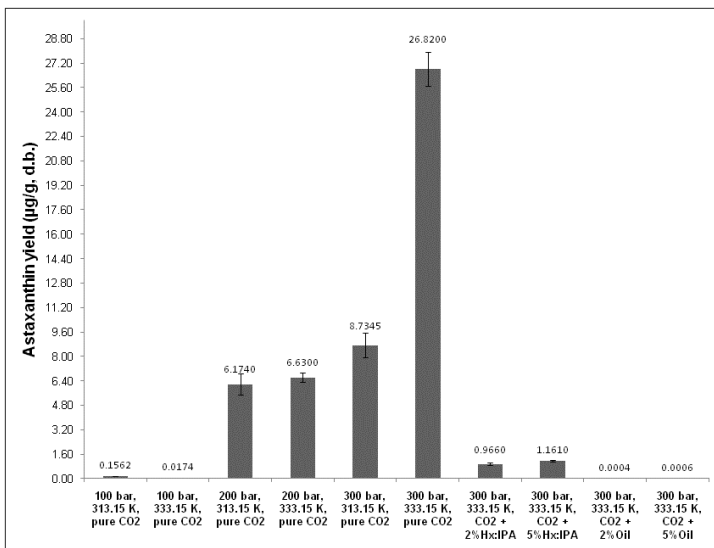


Figure 6.4. Astaxanthin yield ($\mu\text{g/g}_{\text{raw_material}}$) from the pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue extracts obtained by SFE according to the operational conditions applied.

6.3.6 UV-Vis Spectrum of SFE extracts from pink shrimp residue

The UV-Vis spectral profile (200 – 750 nm), presented in Figure 6.5, showed to be qualitatively similar for all the samples, differing only quantitatively. The samples obtained at different pressures, temperatures, and with co-solvents presented two main bands: 280-300 nm characterizing phenolic compounds, especially flavonoids, and 430-480 nm, typically illustrating the occurrence of carotenoids (HARBORNE, 1976). When comparing UV-Vis profiles of SFE samples from the present work with the literature results for conventional techniques of extraction (MEZZOMO et al., 2011a – section 5.3.2.4 of chapter 5), it can be observed a high selectivity to carotenoids and phenolic compounds. The possible presence of these compounds, especially flavonoids, on shrimp waste extracts can be attributed to the shrimp head, mainly composed by the digestive system of the animal, contributing to the presence of compounds from animal feed like marine plants and microalgae. Therefore, the UV-Vis spectrum

confirmed the importance of the extracts, suggesting the presence of components with interesting bioactive properties.

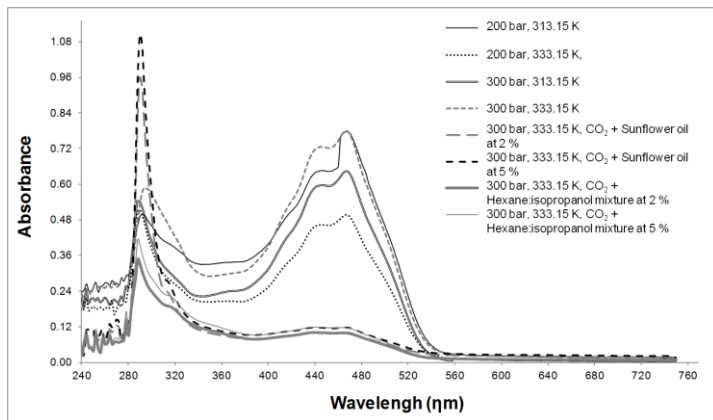


Figure 6.5 UV-Vis spectra (200–750 nm) of the shrimp extracts according to the operational conditions applied to supercritical fluid extraction

6.3.7 Process costs of SFE from pink shrimp residue

The SFE data used for the costs determination were selected according to the present study results and the literature (ROSA and MEIRELLES, 2005; PEREIRA et al., 2007; MEZZOMO et al., 2011b; ALBUQUERQUE and MEIRELLES, 2012): time of annual operation of 24 hours/day during 330 days/year; operational labor cost of US\$ 6.00/hour; raw material cost equal to zero, because of it is an industrial residue; transportation cost equal to zero, considering that the SFE industry was located on same place that shrimp processing industry; 73.41 % of initial moisture content of raw material (untreated shrimp residue); 11.21 % of final moisture content of raw material (submitted to ideal pre-treatment); pre-treatment cost of US\$ 45.00/ton_{raw material} (considering heat treatment, milling and drying); CO₂ cost of US\$ 0.15/kg_{CO₂}; CO₂ lost during extractions of 2 %; electric cost of US\$ 0.0703/Mcal; water refrigeration cost of US\$ 0.0837/Mcal; steam cost of US\$ 0.0133/Mcal; equipment depreciation of 10.0 %/year; SFE temperature and pressure of 333.15 K and 300 bar; CO₂ separation pressure of 40 bar, considering that in this condition all extract is liquid;

constant ratio between raw material mass and CO₂ flow rate as scale-up criterion; batch specific mass of 680 kg/m³; SFE times of 25 min (t_{CER}) and 180 min (total SFE time) and respectively extraction yields of 2.4 and 4.2 %; CO₂ flow rate of 9.6 (equipment 3 x 300 L) and 12.8 ton/hour (equipment 2 x 400 L); and no wastewater treatment because of the remaining solid matrix can be used on animal feed after SFE.

As previously mentioned, the COM is formed by FI, CRM, COL, CUT and CWT. The values and COM contribution of these costs to SFE from pink shrimp residue with different unit sizes and extraction times are presented in Table 6.4.

Table 6.4. Value and COM^(a) contribution of fraction of investment, raw material cost, operational labor cost, utilities cost and waste treatment cost of SFE from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*)

Parameters evaluated ¹		Equipment 2 x 400 L		Equipment 3 x 300 L	
		t _{CER} ² = 25 min	t _{TOTAL} = 180 min	t _{CER} ² = 25 min	t _{TOTAL} = 180 min
Fraction of investment	(x 1000) US\$/year	2,000.00	2,000.00	1,800.00	1,800.00
	% of COM	27.53	31.00	30.27	33.73
Raw material cost	US\$/year	536,785.92	336,441.60	402,589.47	252,331.22
	% of COM	30.03	21.20	27.52	19.22
Operational labor cost	US\$/year	87,912.00	87,912.00	87,912.00	87,912.00
	% of COM	10.89	12.27	13.31	14.83
Utilities cost	US\$/year	563,913.52	563,913.52	422,935.14	422,935.14
	% of COM	31.55	35.53	28.91	32.22
Waste treatment cost	US\$/year	0.00	0.00	0.00	0.00
	% of COM	0.00	0.00	0.00	0.00

¹COM = cost of manufacturing; ²t_{CER} = time of constant extraction rate period.

The results from Table 6.4 indicate that, for both equipments used, the contributions of FI, COL and CUT for COM values are lower at shorter extraction time, where the CRM was higher. The time reduction leads to higher CRM because of the increase in the number of processes performed in a work day, which enhances the amount of raw material and CO₂. Thus, it can be additionally observed from Table 6.4 that CUT and FI represents the major part of COM for all times and equipments

evaluated. These values are justified by the high cost of the SFE unit, which is made of materials adequate to extract processing and has to be resistant to high pressures and also provide energy supply, pump system, water refrigeration and saturated steam. The values for FI, CRM and CUT were lower for the 3 x 300 L unit due to the higher equipment price, higher total volume leading to elevated raw material treatment, and energy expenses (MEZZOMO et al., 2011b), respectively. The CWT for all conditions evaluated was zero because the solid residue (after extraction) can be used for different purposes such as fiber source or fuel for boilers. The solvent used departs the extraction unit as gas phase, or it is recycled in the system. Because the type of solvent used for the extractions is CO₂, no treatment is required.

The values for COM and specific cost, which is relative cost of COM *per* kg of extract, for SFE from pink shrimp residue, are presented in Figure 6.6. The data are presented as function of equipment type and the process time used in SFE.

According to Figure 6.6, the highest COM value was obtained for the lowest SFE time, with a decreasing rate similar for both equipments evaluated, behavior also observed by Mezzomo et al. (2011b) for peach almond oil and by Comim et al. (2010) for banana peel extract. The lower COM value (US\$ 1,620,730) was obtained for 3 x 300 L unit and 180 min. As already mentioned, the increase in the extraction time also reduces the number of procedures during a working period. Therefore, smaller CRM value is achieved due to the lower use of CO₂ and raw material treatment (milling and drying). Alternatively, the specific cost is inversely proportional to the extraction time, as observed in Figure 6.6. The unit with 2 x 400 L provided the lowest cost at 25 min (US\$ 17.78/kg_{extract}), whereas the 3 x 300 L gave the highest value at 180 min (US\$ 71.65/kg_{extract}). The 2 x 400 L unit uses higher solvent flow rate due to the bigger column volume, increasing the mass of extract and reducing the specific cost. Although the COM value decreases with the increase in the extraction time, it is necessary to evaluate the variation in the extraction rate during the process (high extraction rate in the beginning and low extraction rate at the diffusional period), as presented by Mezzomo et al., 2009 and by Comim et al., 2010.

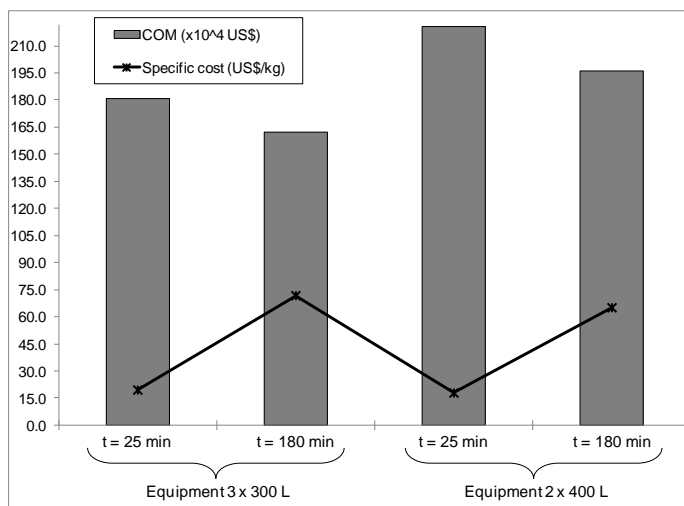


Figure 6.6. Cost of manufacturing (COM) and specific cost of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue extract obtained by SFE in function of equipment and extraction time

6.4 Conclusions

The kinetic study of SFE from pink shrimp processing residue as function of the moisture content of raw material and CO₂ flow rate variables indicates that these parameters influence on mass transfer rate, CER period, and global yield. The modeling of SFE from shrimp residue showed the best adjustments achieved by Sovová's, although good results were also obtained by the logistic and SSP models. However, only Sovová's model supplies information about different mass transfer mechanisms involved on the process and, according to its results, the SFE from pink shrimp has higher influence of convection when compared to diffusion. The adjusted mass transfer correlations indicate that forced convection is more important than natural convection in the process. The shrimp residue, although is considered a processing waste with low commercial value it represents an important raw material to obtain carotenoid extracts with high content of astaxanthin and other carotenoids, mainly β-cryptoxanthin, as well as the presence of flavonoids, which can enhance the process aggregated value. The extraction yield and the carotenoid concentration were

optimized with CO₂ specific mass, whereas the astaxanthin selectivity decreased. The highest astaxanthin yield was obtained at 300 bar and 333.15 K using pure CO₂. Although the use of hexane:isopropanol mixture in SFE was successful to enhance the extraction yield compared with pure CO₂, the system selectivity was not effective to increase the carotenoid concentration. The supercritical process presented interesting aspects related to solvent properties and specific costs when applied to carotenoid extraction from shrimp residue, even though the equipment initial cost is high. The costs results showed that SFE from pink shrimp in the CER period, using the equipment of 2 columns with 400 L, presented a low specific cost. Therefore, the SFE can be considered as a distinguished and productive technology in order to use an industrial residue, not only due to proclaimed advantages over the conventional techniques but also due to the high extract quality (natural pigmentant product), yield and low final product cost.

6.5 References

- ALBUQUERQUE, C. L. C; MEIRELLES, M.A.A. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the Production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2012. (*in press*)
- ALMEIDA, P. P.; MEZZOMO, N; FERREIRA, S. R. S. Extraction of *Mentha spicata* L. volatile compounds: Evaluation of process parameters and extract composition. **Food and Bioprocess Technology** (Online FirstTM), 2010.
- ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; DE REUCK, K. M. **International thermodynamic tables of the fluid state: Carbon dioxide**. Oxford: Pergamon Press, 1976.
- BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132-140, 2010.
- BERTUCCO, A.; SANMARTIN, F.; STORTI, G. Simulated moving bed technology for continuous, countercurrent supercritical extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 8, n. 2, p. 138-148, 1995.
- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. v.4. Darmstadt: Steinkopff, 1994.
- BUENO-SOLANO C.; LÓPEZ-CERVANTES J.; CAMPAS-BAYPOLI, O. N.; LAUTERIO-GARCÍA R.; ADAN-BANTE N. P.; SÁNCHEZ-MACHADO D. I. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. **Food Chemistry**, 112(3), 671-675, 2009.

- CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413-8420, 2008.
- CAMPOS, L. M. A. S.; MICHIELIN, E. M. Z.; DANIELSKI, L.; FERREIRA, S. R. S. Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 163-170, 2005.
- CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Liquid chromatography mass spectrometry of b-carotene and xanthophylls: validation of the analytical method. **Journal of Chromatography A**, v. 854, p. 233-244, 1999.
- COMIM, S. R. R.; MADELLA, K.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from dried banana peel (*Musa* spp., genomic group AAB): Extraction yield, mathematical modeling, economical analysis and phase equilibria. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 30-37, 2010.
- CORREIA, J.; MICHIELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. **Estudo de modelos de transferência de massa para processos de extração supercrítica**. Scientific initiation report (PIBIC- CNPQ). Chemical and Food Engineering Department, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- DANIELSKI, L.; MICHIELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, v. 78, p. 1054-1059, 2007.
- DENERY, J. R.; DRAGULL, K.; TANG, C.S.; LI, Q. X. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, n. 2, p. 175-181, 2004.
- FAMINO, A. O.; ODUGUWA, O. O.; ONIFADE, A. O.; OLOTUNDE, T. O. Protein quality of shrimp-waste meal. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 1, p. 185-188, 2000.
- FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. FISHSTAT, Rome, 2010.
- FIORI, L.; CALCAGNO, D.; COSTA, P. Sensitivity analysis and operative conditions of a supercritical fluid extractor. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 41, n. 1, p. 31-42, 2007.
- GASPAR, F.; LU, T.; SANTOS, B.; AL-DURIN, B. Modeling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.25. n. 3, p.247-260, 2003.
- GILDBERG, A.; STENBERG, E. A new process for advanced utilization of shrimp waste. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 8 - 9, p. 809 - 812, 2001.
- 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.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A guide to modern techniques of plant analysis**. Chapman and Hall, 2 ed, 288 p, 1976.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2006 Brasil**: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: Ibama, 2008.

- KING, M.B.; KASSIM, K.; BOTT, T.R. Mass transfer into near-critical extractants. **Fluid Phase Equilibria**, v. 10, n. 2-3, p. 249-260, 1983.
- KITZBERGER, C. S. G.; LOMONACO, R. H.; MICHIELIN, E. M. A.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 35-43, 2009.
- KUHNEN, S.; LEMOSA, P. M. M.; CAMPESTRINI, L. H.; OGLIARIA, J. B.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 284-290, 2009.
- LA FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, p. 90-95, 2006.
- LIAN, F.; HU, K.; RUSSELL, R. M.; WANG, X. β -Cryptoxanthin suppresses the growth of immortalized human bronchial epithelial cells and non-small-cell lung cancer cells and up-regulates retinoic acid receptor β expression. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 9, p. 2084-2089, 2006.
- LORENZO, Y.; AZQUETA, A.; LUNA, L.; BONILLA, F.; DOMÍGUEZ, G.; COLLINS, A. R. The carotenoid b-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 308-314, 2009.
- MACÍAS-SANCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; LA OSSA, E. M.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O., 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948-952, 2009.
- MADRAS, G.; THIBAUD, C.; ERKEY, C.; AKGERMAN, A. Modeling of Supercritical. Extraction of Organics from Solid Matrices. **AIChE Journal**, v. 40, p. 777-782, 1994.
- MARRONE, C.; POLETTO, M.; REVERCHON, E.; STASSI, A. Almond oil extraction by supercritical CO₂: experiments and modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 53, n. 21, p. 3711-3718, 1998.
- MARTÍNEZ, J.; MONTEIRO, A. R.; ROSA, P. T. V.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Multicomponent Model To Describe Extraction of Ginger Oleoresin with Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial Engineering of Chemistry Research**, v. 42, p. 1057-1063, 2003.
- MARTÍNEZ, J.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of Clove and Vetiver Oils with Supercritical Carbon Dioxide: Modeling and Simulation. **The Open Chemical Engineering Journal**, v. 1, p. 1-7, 2007.
- MEIRELES, M.A.A. Supercritical Extraction from Solid: Process Design Data (2001-2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 7, p. 321-330, 2003.
- MEYERS, S. P.; BLIGH, D. Characterization of Astaxanthin Pigments from Heat-Processed Crawfish Waste. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 505 - 508, 1981.

- MEYERS, S. P.; CHEN, H. M. Process for utilization of shellfish waste, **US Patent** 4505936, 1985.
- MEZZOMO, N.; DE PAZ, E.; MARASCHIN, M.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2012 – **chapter 8 of this thesis**. (*In press*)
- MEZZOMO, N.; MAESTRI, B.; DOS SANTOS, R. L.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue: influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1383–1391, 2011a – **chapter 5 of this thesis**.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Economical viability of SFE from peach almond, spearmint and marigold. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 473–479, 2011b.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10-16, 2009.
- MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5622-5632, 2010.
- MICHELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 33, p. 131–138, 2005.
- 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.
- PACHECO, N.; GARNICA-GONZÁLEZ, M.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, J. Y.; FLORES-ALBINO, B.; GIMENO, M.; BÁRZANA, E.; SHIRAI, K. Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2849–2854, 2009.
- PERDIGÃO, N. B.; VASCONCELOS, F. C.; CINTRA, I. H. A.; OGAWA, M. Extração de carotenóides de carapaças de crustáceos em óleo. **Boletim Técnico Científico da CEPENE**, v. 3, n. 1, p. 234-246, 1995.
- PEREIRA, C. G.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC: Technical and economical analysis. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 232-238, 2007.
- POWELL, M. J. D. **Subroutine BOBYQA**. Department of Applied Mathematics and Theoretical Physics, Cambridge University (2009).
- REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; POULING, B. E. **The Properties of Gases and Liquids**. McGrawHill, 1986.
- ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994–2003). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, p. 109–117, 2005.

- SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N. S. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 85, p. 167–172, 2005.
- 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.
- SIMPSON, B. K.; HAARD, N. F. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. **Journal of Applied Biochemistry**, v. 7, p. 212–222, 1985.
- SOVOVÁ, H. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂ – I. Modelling of extraction curves. **Chemical Engineering Science**. v.49, n. 3, p. 409-414, 1994.
- SUN, L.; SANGKATUMVONG, S.; SHUNG, K.K. A high resolution digital ultrasound system for imaging of zebrafish. **IEEE Ultrason Symposium**. p. 2202–2205, 2006.
- SUN, M.; TEMELLI, F. Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids from carrot using canola oil as a continuous co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 37, p. 397-408, 2006.
- STOREBAKKEN, T.; SORENSEN, M.; BJERKENG, B.; HARRIS, J.; MONAHAN, P.; STEPHEN, H. Stability of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, during feed processing: effects of enzymatic cell wall disruption and extrusion temperature. **Aquaculture**, v. 231, p. 489-500, 2004.
- TAN, C. S.; LIANG, S. K.; LIOU, D. C. Fluid—solid mass transfer in a supercritical fluid extractor. **The Chemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 17-22, 1988.
- TURTON, R.; BAILIE, R. C.; WHITING, W. B.; SHAEIWITZ, J. A. **Analysis, synthesis, and design of chemical process**. PTR Upper Saddle River: Prentice Hall, 1998.
- YU, Z. R.; SINGH, B.; RIZVI, S. S. H.; ZOLLWEG, J. A. Solubilities of fatty acids, fatty acid esters, triglycerides, and fats and oils in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 7, n. 1, p. 51-59, 1994.
- WAKAO, N.; KAGUEI, S. **Heat and Mass Transfer in Packed Beds**. Gordon and Breach, New York, 1982.
- WEINHOLD, T. S.; BRESCIANI, L. F. V.; TRIDAPALLI, C. W.; YUNES, R. A.; HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. *Polygala cyparissias* oleoresin: Comparing CO₂ and classical organic solvent extractions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 109-117, 2008.
- WELTY, J. R.; WICKS, C. E.; WILSON, R. E. **Fundamentals of Momentum, Heat and Mass Transfer**. New York: John Wiley & Sons, 1983.
- ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE Units for University education and comparative research. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, v. 1, p. 577, 2003.

CAPÍTULO 7: ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DO RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA

Este capítulo mostra a avaliação das atividades antioxidante, anti-obesidade e hipolipemiante dos extratos do resíduo de processamento de camarão rosa obtidos por diferentes técnicas de extração. O estudo descrito neste capítulo atende aos seguintes objetivos específicos da presente tese, de acordo com a seção 1.2: avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de resíduo de camarão através das técnicas do radical DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoléico; avaliar o conteúdo em ácidos graxos e de compostos fenólicos dos extratos de camarão obtidos por diferentes tecnologias e associar com os efeitos hipolipemiante e anti-obesidade; avaliar as atividades hipolipemiante e anti-obesidade *in vivo* de extratos de resíduo de camarão.

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi obtida no mercado público de Florianópolis/SC/Brasil e submetida a tratamento térmico, secagem e moagem, de acordo com os resultados do capítulo 5. Os métodos de extração empregados para obtenção dos extratos de resíduo de camarão foram: Soxhlet e maceração com os solventes hexano, isopropanol:hexano (50:50, v/v), isopropanol, etanol e acetona; extração com óleo vegetal (soja e girassol) a quente e a frio; ESC nas condições de 313,15 e 333,15 K e de 200 a 300 bar, empregando CO₂ puro; ESC nas condições de 333,15 K e 300 bar, empregando CO₂ adicionado de 2 % (m/m) de co-solvente (hexano:isopropanol, 50:50 v/v, e óleo de girassol). Os extratos foram avaliados quanto a sua capacidade antioxidantes pelos métodos do radical DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoléico; perfil de ácidos graxos; teor de fenólicos totais; atividades anti-obesidade e hipolipemiante *in vivo*. Os resultados indicaram que maiores atividades antioxidantes foram obtidas para os extratos alcoólico e cetônico, dentre os sistemas a baixa pressão, e nas máximas pressões de ESC. Os extratos apresentaram alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente os ω -3 EPA e DHA e de compostos fenólicos. O extrato ESC (333.15 K/300 bar) a 50 mg/kg.d apresentou os melhores efeitos anti-obesidade (79-84 %) e hipotrigliceremiante. Os extratos Soxhlet promoveram as maiores reduções nos níveis de colesterol sérico.

Na sequência, o trabalho completo realizado neste capítulo está apresentado no formato de artigo e no idioma inglês, exigido pelos periódicos internacionais de alto impacto da área*.

*Artigo a ser enviado para o periódico *Lipids in Health and Disease*.

Effect of extraction systems on the biological activity of extracts of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue

ABSTRACT

The objective of this work was estimate the biological properties of the extracts obtained from pink shrimp residue, evaluated according to its antioxidant activity, anti-obesity and hypolipidemic effects, associating these results with the chemical composition of extracts and, as a consequence, with the extraction procedure used. The raw material was pre-treated combining heat treatment, drying, and milling. The extracts were obtained by Soxhlet (SOX) and by maceration (MAC) using hexane, hexane:isopropanol (50:50) (Hx:IPA), isopropanol, ethanol and acetone as solvents; by Ultrasound with ethanol; by Cold and hot oil extraction with soy and sunflower oils; and by Supercritical fluid extraction (SFE) with pure CO₂ (100-300 bar; 313.15-333.15 K) and with co-solvent (Hx:IPA and sunflower oil at 2%). The antioxidant activity was determined by the free radical scavenging activity (DPPH) and by the β -carotene bleaching method. The fatty acid composition was determined by gas-chromatography analysis and the total phenolic compounds by de Folin–Ciocalteu method. The anti-obesity and hypolipidemic effects were evaluated *in vivo* submitting the animals to a high-fat diet combined with shrimp extracts during 30 d. The animals' weight lost during the treatment and the final total serum cholesterol and triglycerides levels were monitorated. Higher antioxidant activities were observed by the β -carotene bleaching method in alcoholic and cetonic extracts, among the conventional extractions, and at higher pressures for the SFE. The shrimp residue extracts showed higher content of polyunsaturated fatty acids, especially ω -3 EPA and DHA, and phenolic compounds. The SFE (333.15 K/300 bar) extract at 50 mg/kg.d showed the best anti-obesity and hipotriglycerimiant effects. SOX extract promoted highest reduction on serum cholesterol levels.

Keywords: supercritical fluid extraction; fatty acids; antioxidant activity; anti-obesity effect; hypolipidemic agent.

7.1 Introduction

According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2010), the worldwide capture production of marine crustaceans reached, in 2009, the total of five thousands ton. The shrimp when is not marketed as "fresh", is used to obtain industrial products

without head, generating waste as the cephalothorax, or products completely stripped, with the residue of the carapace and exoskeleton (FAMINO et al, 2000). The use of shrimp processing waste represents a potential source of food ingredients and other additives and the use of industrial wastes is not only economic, but also environmental important (MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5; chapter 6).

The marine wildlife is rich in high quality fatty acids with proved biological value, being present in industrial and commercial residues of the marine products processing. The marine fishes and crustaceans are important constituents from human diet and possess the highest source of essential polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially from the groups of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexanoic (DHA) acids, from ω -3 family. The scientific researches focusing on this fatty acids have been intensified lately because they are involved in prevention and cure of cardiovascular and inflammatory diseases (BRUM et al., 2002).

The astaxanthin is the main carotenoid present in aquatic animals, such as crab, lobster, and shrimp. This pigment presents protection against free radicals, lipid peroxidation, oxidative damage to the LDL-cholesterol, oxidation of essential PUFAs, UV-light, among others (HU et al., 2006). Otherwise, synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) are generally used in fatty and oily industries. However, scientific works have proved that these substances can cause adverse effects in animals such as hemorrhages in the pleural and peritoneal cavities (TAKAHASHI and HIRAGA, 1978) and extensive cell proliferation in the lung with biochemical changes, acting as a promoter of adenoma development (WITSCHI and LOCK, 1978). The concern related to these adversities has enhanced, in recent years, the search for natural antioxidants with the same efficiency and function of the synthetic ones (PASSOTO et al., 1998).

The hypertriglyceridemia or dyslipidemias are lipidic metabolic changes caused by a disorder in the lipid metabolism, which promote modifications in serum lipoprotein (GOTTO et al., 1993). In laboratory results, the dyslipidemia can be detected by isolated hypercholesterolemia, mixed-hyperlipidemia, or by decreasing in HDL-cholesterol alone or in association with the increase of LDL-cholesterol and/or triglycerides. Dyslipidemias can be caused by genetic problems (named primary dyslipidemias), which some of them can be only manifested due to environmental influences, or by other diseases or some medication use (named secondary dyslipidemias) (SINGH and

MEHTA, 2002). The drugs used on the dyslipidemic treatment are the hypolipidemic agents.

Obesity is a serious public health problem both in developed and developing countries (FRIEDMAN, 2009) and has increased dramatically in recent years. It is characterized by excessive accumulation of body fat resulting from an imbalance between energy intake and expenditure, and indeed, obesity is an important risk factor associated with the increase of death from cardiovascular disease, diabetes, chronic kidney disease, and some types of cancers (WEAVER, 2008; WHO, 2009; FERREIRA et al., 2011). The obesity and associated diseases are closely linked with modern lifestyle, with an abundant nutrient supply and reduced physical activity (FRIEDMAN, 2003). Thus, a high-fat intake diet can contribute to the development of obesity and hyperlipidemia, increasing body fat mass and/or visceral fat, and also changing the level of lipids in plasma and tissues (WOO et al., 2008). Accordingly, efforts towards the development of new and more effective hypolipidemic drugs led to the discovery of some natural and synthetic therapeutics agents (FERREIRA et al., 2011).

Biological compounds are present in plants, mushroom and animal sources but the use of a specific extraction method is important to select substances or a group of components of interest. There are several usual procedures to extract biological active compounds such as maceration (GILDBERG and STENBERG, 2001; WEINHOLD et al., 2008; MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5), Soxhlet (MEZZOMO et al., 2010; BENELLI et al., 2010; MEZZOMO et al., 2011a – chapter 5), ultrasound (SUN et al., 2006; MACÍAS-SANCHÉZ et al., 2009); oil extraction (MEYERS and CHEN, 1985; GILDBERG and STENBERG, 2001); and supercritical technology (MEZZOMO et al., 2009; KITZBERGER et al., 2009; COMIM et al., 2010; JESUS et al., 2010; KVICINSKI et al., 2011; chapter 6). Each method presents advantages and disadvantages, and the effectiveness of each technique depends on the product application and quality, allied to the economical viability of the processes (MEZZOMO et al., 2011b).

The aim of this work was the estimation of the biological properties of extracts of pink shrimp (*Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*) residue, represented by the antioxidant, anti-obesity and hypolipidemic activities, and also relates these properties with the extraction systems used to provide the extracts and their chemical composition.

7.2 Material and methods

7.2.1 Sample preparation

The raw material consists of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue (waste from shrimp processing), composed essentially by head, carapace, and tail. The residue was provided by Peixaria Nelson Santos (Florianópolis, Santa Catarina, southern Brazil), sited at the local public market. The raw material was obtained from the unpeeling of the cultivated shrimp collected in May 2010, which represents the high production season of the region. The shrimp residue was pre-treated by combining the process of heat treatment, drying and milling, as designed by Mezzomo et al. (2011a) (results from section 5.3.1). The pink shrimp processing waste was submitted to a quick heat treatment by double boiler in water at 373.15 K during 10 min, followed by drying at 333.15 K for 5 hours (when using the extraction techniques: Soxhlet, maceration, ultrasound, and oil extraction) or 10 hours (when using supercritical extraction) in a oven with air circulation (DL-SE, DeLeo). Finally, the samples were grounded in a domestic blender (LiqFaz, Wallita) with mass and time pre-determined.

7.2.2 Extraction protocols

7.2.2.1 Low pressure extractions

The maceration (MAC) method consisted in a cold extraction of the pre-treated shrimp residue in organic solvent to avoid thermal degradation. The procedure was performed according to Mezzomo et al. (2011a) (section 5.2.5.2). Briefly, it consists of transferring 25 g of the sample into 100 mL of selected organic solvent for five days at room temperature, with light protection and one daily manual agitation. Each extraction was performed in triplicate using the solvents hexane (Hx), ethanol (EtOH), acetone (Ac), isopropanol (IPA), and the binary mixture Hx:IPA (50:50, v/v). All the chemicals are authorized by General Recognized as Safe (GRAS) solvents and are usually used in food industry (FOOD AND DRUG REGULATION, 2005). The mixture of raw material, extract, and solvent was separated by means of cellulose filtration, followed by concentration under vacuum in a rotatory evaporator (for details please see section 3.4.2).

The Soxhlet extraction (SOX) was performed in triplicate and based on the procedure described by Campos et al. (2008). Briefly, the raw material (5 g) was packed inside a cartridge and transferred to a 250 mL extractor device and submitted to 8-hour recycling extraction with 150 mL solvent at boiling temperature. The extraction was performed with

the following solvents (P.A., Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA., Brazil): Hx, EtOH, Ac, IPA and Hx:IPA (50:50, v/v). The extracts were concentrated under vacuum in a rotatory evaporator (for details please see section 3.4.1).

The ultrasound extraction (UE) was performed in triplicate and adapted from Gu et al. (2008). Briefly, it consists of adding 5 g of raw material in 150 mL of EtOH, maintaining the solution into an ultrasound apparatus (UltraCleaner 700, 55 kHz, 40 VA, Unique) for 10 min. The extract was separated from the raw material by centrifugation (Q222T, Quimis) at 2,000 g for 20 min and concentrated under vacuum in a rotatory evaporator.

The extraction method using vegetable oil as solvent was classified according to the solvent temperature and oil type. The cold extraction (OilC) and the hot extraction (OilH) with soy or sunflower oil were performed according to the procedure presented by Sachindra and Mahendrakar (2005), in triplicate. Briefly, the method consists of mixing 10 g of raw material with 40 mL of vegetable oil (soy or sunflower oil) in a 250 mL flask (light protected), submitted to hot plates with 2h-agitation period at room temperature (OilC) or at 343.15 K (OilH). Further, the oil extracts were recovered by cellulose filtration.

7.2.2.2 Supercritical Fluid Extraction

The supercritical fluid extraction (SFE) from pink shrimp processing waste was performed in a dynamic extraction unit (ZETZL et al., 2003) (for details please see section 3.5). A co-solvent pump (Constametric, 3200, EUA), was connected to the extraction line in order to supply the modifier (organic solvent mixture or vegetable oil at high-pressure) at pre-established flow rate, to mix with CO₂ flow before the extraction vessel. The extraction procedure (MICHIELIN et al., 2005), consisted of placing a fixed mass of 16 g of pretreated shrimp residue inside the extractor cell to form the particles fixed bed, followed by the control of the process variables (temperature and pressure). The extraction was then performed and the solute collected in amber flasks after 180 min and weighed on an analytical balance (OHAUS, Model AS200S, NJ – USA). The SFE assays were divided into 2 groups: (a) pure CO₂ assays, using carbon dioxide as solvent and at the conditions of 313.15-333.15 K and 200-300 bar at a constant solvent flow rate of 13.3 ± 0.8 g/min; (b) the co-solvent assays, where the hexane:isopropanol solution (50:50, v/v) and sunflower oil was mixed with supercritical CO₂, at concentrations of 2 % (w/w), according to

results from section 6.3.3 of chapter 6 (no significant increase on extraction yield when co-solvent concentration enhanced from 2 % to 5 %). This group of assays was performed at 333.15 K and 300 bar and in the case of the organic solvent solution, it was separated from the extract at reduced pressure by evaporating the solvents used in a rotary evaporator (Fisatom, 802, Brazil), with vacuum control. The SFE process used 99.9 % pure CO₂ delivered at pressure up to 60 bar (White Martins).

7.2.3 Antioxidant activity

7.2.3.1 Free radical scavenging activity (DPPH)

The free radical scavenging activity of the shrimp residue extracts was evaluated using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) radical scavenger method. Briefly, the shrimp extracts was mixed with a 0.3 mM of DPPH ethanol solution to give final concentrations of 5, 50, 100, 250, 500 and 1000 µg/mL of DPPH solution. After 30 min at room temperature, the absorbance values were measured at 517 nm converted into percentage of antioxidant activity (% AA). This activity was also expressed as the effective concentration at 50 % (EC₅₀), i.e., the concentration of the solution required to give a 50 % decrease in the absorbance of the test solution compared to a blank solution (MENSOR et al., 2001). The result data for DPPH assays were obtained considering the mean value of triplicate assays (for details, please see section 3.6.4.1).

7.2.3.2 β-carotene bleaching method

In this method a model system made of β-carotene and linoleic acid undergoes a rapid discoloration in the absence of an antioxidant. The free linoleic acid radical is formed upon a hydrogen reduction by the β-carotene molecules, changing its color (MATTHÄUS, 2002). The β-carotene bleaching rate was determined by the difference in absorbance values, measured at 470 nm, at time intervals between 0 to 120 min. The method is extensively described in section 3.6.4.2, it was conducted in triplicate, and the results were expressed as percentage of antioxidant activity (%AA).

7.2.4 Total phenolic compounds (TPC)

The total phenolic compounds (TPC) was determined for the SOX-EtOH and SFE with pure CO₂ at 333.15 K/300 bar extracts according to the Folin-Ciocalteu method (PESCHEL et al., 2005). Briefly, the

reaction mixture was composed by 0.1 mL of extract, 7.9 mL of distilled water, 0.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent and 1.5 mL of 20% sodium carbonate, placed in opaque flasks. The flasks were agitated, held for 2 h at room temperature, and the absorbance was measured at 765 nm. The TPC was calculated according to a standard curve, prepared previously with gallic acid as standard (Nuclear, CAQ Ind. and Com. Ltda., Brazil). The values were expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of the extract (mgGAE/g) (VINSON et al., 2001) (for details, please see section 3.6.5). The samples SOX-EtOH and SFE 333.15 K/300 bar (using pure CO₂) were analyzed by TPC analysis in order to associate their composition with the anti-obesity and hypolipemiant *in vivo* results, which evaluated these samples.

7.2.5 Fatty acid composition

The fatty acid composition of the shrimp residue extracts was determined by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) according the Ce 1f-96 Method of A.O.C.S. (2002), detailed in section 3.6.6. The samples SOX-EtOH and SFE 333.15 K/300 bar (using pure CO₂) were analyzed by CG-FID in order to associate their composition with the anti-obesity and hypolipemiant *in vivo* results, which evaluated these samples.

7.2.6 Anti-obesity and hypolipidemic effects

In order to evaluate the hypolipidemic effect of the shrimp residue extracts in an *in vivo* analysis, 36 *knocaut* (LDL receptor) male and female mice weighting 21 ± 4 g were recruited from the Central Biotery of the Federal University of Santa Catarina. The mice were housed under controlled conditions, i.e., 12-hour light-dark cycle, 295.15 ± 2 K, 60 % air humidity, with free access to standard laboratory feed and water. The animals were allowed to acclimate for at least 7 days prior the treatment and manipulated in accordance with the legal requirements appropriate to the species (Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH publication #85.23, revised in 1985) and also with the local committee (PP00604/2011.0337 of CEUA/UFSC).

The animals were divided into 6 groups according to their body weight (6 animals each group): a) nontreated group (negative control): this group received just regular *ad libitum* feed and water supply (no shrimp residue extract and no high-fat diet supply); b) high-fat group (positive control), fed with a high-fat diet and water (no shrimp residue extract supply); c) SOX 50 group, where the high-fat diet, water, and

Soxhlet-ethanol shrimp residue extract at 50 mg/kg_{rat} per day were administered; d) SOX 200 group, supplied with the high-fat diet, water, and Soxhlet-ethanol shrimp residue extract at 200 mg/kg_{rat} per day; e) SFE 50 group, to which it was administered the high-fat diet, water and SFE 300 bar/333.15 K shrimp residue extract at 50 mg/kg_{rat} per day; and f) SFE 200 group, supplied with the high-fat diet, water and SFE 300bar/333.15K shrimp residue extract at 200 mg/kg_{rat} per day. The high-fat diet is defined by Rothwell et al. (1982) and is composed by cafeteria food, such as chocolate and milk cookies, peanuts, potato chips, cheese, among others. The shrimp extracts obtained by Soxhlet with ethanol and by SFE at 333.15 K and 300 bar with pure CO₂ was selected to the anti-obesity and hypolipidemic assays due to their elevated extraction yield and carotenoid content, according to the results from Mezzomo et al. (2011a) (results from section 5.3.2). The extract solutions were administered orally by gavage. The weight of the animals from all groups was monitored 3 times a week during the entire treatment period (30 days). Thirty days after the treatment beginning, samples of the animals' blood was collected and used for the determination of cholesterol and triglycerides contents, performed using enzymatic methods (ABELL et al. 1952; BUCOLO and DAVID, 1973) (for details, see section 3.6.7).

7.2.7 Statistical Analysis

The results of the antioxidant activity (EC₅₀ and %AA) and the hypolipidemic effects (weight reduction, cholesterol, and triglycerides contents) were statistically evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA), using the statistical package Statistica for Windows (Statsoft Inc., USA). The significant differences at level of 5 % were analyzed by Tukey test.

7.3 Results and discussion

7.3.1 Antioxidant activity

The antioxidant activity (%AA) results, determined by the free radical scavenging (DPPH) and by the β -carotene bleaching methods, for the shrimp residue extracts are showed in Table 7.1.

The extracts obtained by low pressure operations that presented the highest antioxidant activity according to DPPH method were MAC-EtOH and MAC-Ac (65.9 ± 0.9 % and 58 ± 1 %, respectively), followed by the extracts MAC- IPA, SOX-EtOH and SOX-Ac (Table 7.1). In addition, the extracts MAC-EtOH and MAC-Ac presented the lowest

effective concentration at 50 % (EC₅₀), i.e., 736 ± 5 and 826 ± 5 µg/mL, respectively. These values represent the extract concentration sufficient to inhibit 50% of free radical activity. These results indicate that the antioxidant compounds presented in the pink shrimp residue present affinity to highly polar solvents (polarity between 5.1 and 5.2, according to Byers, 2009). The good performance of the polar solvents in maceration method, applied to concentrate antioxidant compounds from natural products, was also observed by Kitzberger et al. (2007), by Campos et al. (2008) and by Almeida et al. (2010), for the raw materials of shiitake, grape pomace and *Mentha spicata*, respectively.

Table 7.1 Antioxidant activity (% AA) and effective concentration at 50 % (EC₅₀) obtained by the free radical scavenging activity method (DPPH) and the β-carotene bleaching method of shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue extracts.

Extraction method ¹	Solvent ²	% AA (DPPH) ^{3,4}	EC ₅₀ (µg/mL) ^{3,5}	% AA (β-carotene) ^{3,6}
SOX	Hx	4.0 ± 0.3 ^a	13466 ± 1014 ^h	57 ± 4 ^{de}
SOX	HxIPA	18.1 ± 0.3 ^{ef}	2778 ± 65 ^{ef}	68 ± 7 ^{bcd}
SOX	IPA	9.0 ± 0.1 ^{bc}	5314 ± 58 ^{gh}	76.56 ± 0.08 ^{abc}
SOX	EtOH	29.6 ± 0.9 ^{gh}	1690 ± 74 ^d	59 ± 3 ^{de}
SOX	Ac	29.1 ± 0.6 ^{fgh}	1717 ± 34 ^d	88 ± 3 ^a
MAC	Hx	17 ± 1 ^e	1937 ± 57 ^{ef}	69 ± 6 ^{bcd}
MAC	HxIPA	17 ± 4 ^{de}	3765 ± 98 ^{ef}	28 ± 5 ^{gh}
MAC	IPA	38 ± 1 ^h	1440 ± 6 ^c	31 ± 6 ^{gh}
MAC	EtOH	65.9 ± 0.9 ^h	736 ± 5 ^a	82 ± 2 ^{ab}
MAC	Ac	58 ± 1 ^h	826 ± 5 ^b	84 ± 1 ^{ab}
EU	EtOH	17 ± 1 ^e	2810 ± 150 ^{ef}	38 ± 5 ^{fg}
OilH	Sun-oil	8.4 ± 0.7 ^{fg}	2684 ± 23 ^e	50 ± 3 ^{ef}
OilH	Soy oil	7.0 ± 0.5 ^f	2256 ± 25 ^e	8 ± 1 ⁱ
OilC	Sun-oil	3 ± 1 ^f	3481 ± 181 ^{fg}	16 ± 2 ^{hi}
OilC	Soy oil	3.8 ± 0.5 ^f	4703 ± 42 ^{fg}	2.8 ± 0.6 ⁱ
SFE 313.15 K/200 bar	CO ₂	7.3 ± 0.4 ^b	6008 ± 713 ^h	50.2 ± 0.9 ^{ef}
SFE 333.15 K/200 bar	CO ₂	15 ± 1 ^e	2722 ± 478 ^{ef}	59 ± 7 ^{de}
SFE 313.15 L/300 bar	CO ₂	15 ± 2 ^e	2970 ± 921 ^{ef}	87 ± 4 ^a
SFE 333.15 K/300 bar	CO ₂	30 ± 1 ^{fgh}	1720 ± 91 ^d	72 ± 6 ^{abcd}
SFE 333.15 K/300 bar	CO ₂ + 2% Sun-oil	18 ± 2 ^e	2634 ± 79 ^{ef}	69 ± 3 ^{bcd}
SFE 333.15 K/300 bar	CO ₂ + 2% Hx:IPA	35 ± 3 ^{fgh}	1698 ± 43 ^d	83 ± 3 ^{ab}

¹SOX = Soxhlet, MAC = maceration; UE = ultrasound; OilH = hot oil extraction; OilC = cold oil extraction; SFE = supercritical fluid extraction; ²Hx = hexane; HxIPA = hexane+isopropanol (50:50); IPA = isopropanol; EtOH = ethanol; Ac = acetone; Sun-oil = sunflower oil; CO₂ = carbon dioxide; ³Same letter in same column indicates no statistical difference (p < 0.05); ⁴AA referent to DPPH method at extract concentration of 1000 µg/mL; ⁵Effective concentration at 50%; ⁶AA referent to β-carotene bleaching method obtained after 120 min-reaction at extract concentration of 1667 µg/mL.

The antioxidant activity performance of the extract obtained by vegetal oil extraction (OilC and OilH) was determined considering the DPPH antioxidant results of the pure oils, being that the final results were obtained by the difference between pure oil and enriched oil results. According to the results presented in Table 7.1, the antioxidant activity values, by the DPPH method, obtained from the oily extracts (OilC and OilH) were the lowest values compared to the results obtained for the other extraction methods. Besides this result, the shrimp residue extract can be used to enrich the sunflower and soy oil in order to increase their shelf-life or to use the final product (enriched oils) in food formulations with antioxidant compounds incorporated.

When %AA and EC₅₀ results, obtained by DPPH method, were related to heat application in different systems used to the extraction, two contradictory behaviors were observed (Table 7.1): a) the high temperatures (equivalent to the solvent boiling temperature) used in the SOX method can damage the extraction of antioxidant components, compared to the same solvents used in MAC extraction (low temperature method); b) higher temperatures in vegetal oil extraction, by the OilH method, promoted higher %AA when compared to the OilC method. These results can indicate that the antioxidant compounds presented in shrimp processing residue are better extracted when heat is applied until 343.15 K, however the heating exposure should not be prolonged above 2 hour as for OilH systems. When higher temperatures and/or heating exposure times are employed, the antioxidant compounds may suffer thermal degradation with the increasing temperature (HU et al., 2005), a phenomenon that probably occurred for the samples obtained by the SOX extraction.

The DPPH results for the samples obtained by SFE process are also listed in Table 7.1, which shows that the extracts obtained by SFE at 333.15 K/300 bar, with CO₂ and with CO₂ plus Hx:IPA, presented the highest antioxidant activity values, statistically similar to SOX-EtOH and SOX-Ac extracts. The DPPH results for SFE extracts indicated that the %AA increased significantly with the pressure enhancement, from 200 to 300 bar, at constant temperature, and with the temperature increase, from 313.15 to 333.15 K, at constant pressure. This behavior is probably associated with the higher content of astaxanthin in shrimp residue extract obtained by SFE at higher pressures and temperatures, as presented by the results from section 5.3.2.3 (chapter 6 of this thesis). According to Shimidzu et al. (1996), the astaxanthin compounds present proved antioxidant properties. Also, the astaxanthin components are

more soluble in supercritical CO₂ when higher pressure and temperature are applied in the supercritical technology (LA FUENTE et al., 2006; MEZZOMO et al., 2012 – chapter 8 of this thesis).

The results of the %AA determined by the β -carotene beaching method are also presented in Table 7.1, and were similar to the data from DPPH method, where the highest %AA values were obtained by polar solvents for the extract obtained at low pressure procedures. Alternatively, the β -carotene results were higher than the DPPH values, for all extracts analyzed, with highest results from the extracts by SOX-Ac, MAC-Ac, MAC-EtOH and SOX-IPA, equivalent to 88 ± 3 , 84 ± 1 , 82 ± 2 and 76.56 ± 0.08 %, respectively (Table 7.1). These results are close to the %AA value obtained by the BHT (113 ± 7 %) performance, as described by Benelli et al. (2010), for the same conditions evaluated in the present work. The highest potential obtained by the β -carotene beaching method above the DPPH is probably due to the presence of astaxanthin in these extracts, besides other antioxidant non-polar compounds, that are better detectable by the carotenoic method.

Similarly to the DPPH method, the β -carotene results from the extract obtained by vegetal oil extraction (OilC and OilH) were determined considering the %AA of pure oils. Among the oil extraction results from Table 7.1 we observe that the most efficient system was the OilH-sunflower, statistically equal to SOX-Hx, SOX-EtOH, and SFE at 200 bar, corroborating the previous suggestion about the use of this extract to increase the vegetal oil shelf-life and/or to enrich the antioxidant content when using it in food processing.

The SFE extracts also presented significant results of %AA from the β -carotene beaching method. The highest value was observed for the extracts obtained at 313.15 and 333.15 K/300 bar using pure CO₂ and when it was added to 2% of Hx:IPA. Because of the satisfactory %AA detected by the β -carotene beaching method, we suggest the use of the mentioned extract in pharmaceutical or food products in order to prevent oxidant reactions.

7.3.2 Fatty acids profile and total phenolic compounds

The composition profiles for saturated and unsaturated fatty acids, present in the shrimp residue extracts obtained by different extraction methods (SOX-EtOH, and SFE at 333.15 K/300 bar with pure CO₂), was detected by the GC-FID analysis. The results comparing samples obtained by different methods are presented in Figure 7.1.

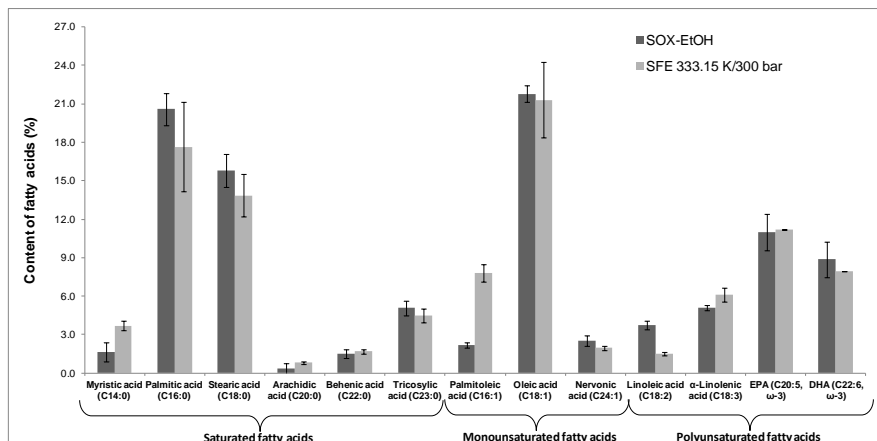


Figure 7.1 Fatty acids profile of shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue extracts obtained by Soxhlet with ethanol (SOX-EtOH) and supercritical fluid extraction (SFE).

The results from Figure 7.1 indicate that the shrimp residue extracts contains a high content of saturated fatty acids, with relative concentration ranging from $42 \pm 6 \%$, for SFE sample, to $44.9 \pm 0.4 \%$ for SOX-EtOH, related to the total fatty acid content. From Figure 7.1, it is possible to determine that palmitic and stearic acids are the most representative saturated fatty acids for the shrimp residue extracts, both present in concentrations that are statistically similar. Following the above mentioned saturated fatty acids are the tricosylic and the myristic saturated fatty acids, present in concentrations below 6%. Also, only the tricosylic acid presents statistically different concentrations between both extracts evaluated.

The unsaturated fatty acids (monounsaturated + polyunsaturated) are the main fatty acid group present in shrimp residue extracts, as demonstrated in Figure 7.1, with $55 \pm 5 \%$ for SOX-EtOH extract and $58 \pm 5 \%$ for SFE sample.

The monounsaturated fatty acids represent a great variety of total fatty acid content (relative concentration) for pink shrimp residue extracts, ranging from $26 \pm 1 \%$ for SOX-EtOH to $31 \pm 4 \%$ for SFE sample. According to Figure 7.1 results, oleic acid was the major monounsaturated fatty acid present in shrimp extract samples and in statistically equal concentration for both samples (SOX and SFE extracts). The second most representative monounsaturated fatty acid

was the palmitoleic acid in the SFE sample, and linoleic acid in the SOX-EtOH, all in statistically different concentrations between different extract samples.

The Figure 7.1 also shows that the eicosapentaenoic (EPA) and the docosahexanoic (DHA) components, fatty acids from ω -3 group, are the most representative PUFAs for shrimp residue extracts, detected in both extracts at statistically equal relative concentrations. In recent years the researches about long chain ($>C18$) ω -3 PUFAs, found primarily in fish oils, have been substantially increased. These researches suggest a wide range of health beneficial effects of the fish oils on autoimmune and cardiovascular diseases, cancer and mental health disorders (SHAHIDI and MIRALIAKBARI, 2004; SHAHIDI and MIRALIAKBARI, 2005). Besides, ω -3 PUFAs have protective effects such as: anti-inflammatory, antithrombotic, antiarrhythmic, hypolipidemic and vasodilatory properties (SIMOPOULOS, 2007).

In addition, the results of the present study revealed a ω -6/ ω -3 fatty acids ratio of 0.15 for SOX-EtOH extract and 0.06 for SFE sample. According to Furuya et al. (2006), these values indicated a good nutritional value for the extracts, mainly for a natural ω -3 source. FAO/WHO (1994) points to a ω -6/ ω -3 ratio in the human diet between 5 and 10 for health maintenance, which allows the use of shrimp residue extract combined with other natural sources of ω -6 fatty acids to maintain the recommended ω -6/ ω -3 ratio.

In comparison with other shrimp and marine species, the extracts from the *P. brasiliensis* and the *P. paulensis* residue obtained by SOX-EtOH and SFE (present work) showed higher EPA and DHA contents compared to the Northern shrimp (*Pandalus borealis* Kreyer) by-products (heads, shell and tail), obtained by SFE at 350 bar/333.15 K and by SOX-Ac (7.0-7.8% of EPA and 6.7-8.0% of DHA - AMIGUET et al., 2011) and freshwater fish (*Hypophthalmus* sp.) from Central Amazonia (2.0 \pm 0.3 % of EPA and 1.8 \pm 0.3 % of DHA - INHAMUS and FRANCO, 2008).

The TPC results for the shrimp residue extracts were of 26.4 \pm 0.1 and 14 \pm 1 mgGAE/g for SOX-EtOH and SFE extracts respectively. Polyphenols are a group of compounds that are structurally classified as flavonoids, phenolic acids, lignans, and stilbens (TIERNEY et al., 2010). Marine macroalgae are rich sources of polyphenolic antioxidants such as catechins, flavonols, flavonol and phlorotannins in particular (HEO et al., 2005). The shrimp extract presents nonphenolic compounds (such as amines and oleic acid) that could react with the Folin-

Ciocaulteu reagent, elevating the TPC (PRIOR et al., 2005). Otherwise, its content is really high to an animal raw material and its occurrence is probably associated with the presence of the shrimp head in the residue, which conserves its diet, rich in marine microalgae.

The same SOX-EtOH and SFE 333.15 K/300 bar extracts were evaluated for their total carotenoid content by Mezzomo et al. (2011a), showed in section 5.3.2.2 of chapter 5, and in section 6.3.4 of chapter 6, reaching the results of, respectively, 25.6 ± 0.9 and 894 ± 13 $\mu\text{g/g}$. Considering the biological importance of astaxanthin, the major carotenoid in shrimp residue extracts (MEZZOMO et al., 2011a – section 5.3.2.3 of chapter 5; section 6.3.5 of chapter 6 of this thesis), and also to the high content of ω -3 fatty acids and phenolic compounds detected in the shrimp residue extracts, the samples (SOX-EtOH and SFE 333.15 K/300 bar) were submitted to the evaluation of anti-obesity and hypolipidemic effects according to the procedure described in section 7.2.6, with the following results detected.

7.3.3 Anti-obesity and hypolipidemic effects

The anti-obesity and the hypolipidemic *in vivo* analysis detected the weight gain of the treated mice for all groups tested (positive control, negative control, SOX 50, SOX 200, SFE 50 and SFE 200) as a function of period of treatment. The weight gain results are showed in Figure 7.2.

Comparing the body weight of animals treated with shrimp extract (SOX and SFE groups) with the positive control group, the extracts promoted a weight reduction of 0-55 % in the SOX 50 group, 29-65 % in the SOX 200 group, 79-84 % in the SFE 50 group, and 29-55 % in the SFE 200 group, among 7, 14, 21 and 28 days of high fat diet. From these data we observe that the best behavior was achieved by the mice from the group SFE 50 (the lowest weight gain compared to the positive control group), followed by the negative control group (low fat diet and no extract administration) during all treatment. These results were statistically lower compared to the weight gain results from all other groups. Therefore the SFE extract administered at 50 mg/kg.d showed the best anti-obesity effect.

The weight reduction observed by the administration of the shrimp extracts can be associated to the presence of flavonoids, astaxanthin, EPA and DHA (results of Mezzomo et al., 2011a – sections 5.3.2.3 and 5.3.2.4 of chapter 5, sections 6.3.5 and 6.3.6 of chapter 6, and of the present chapter). These components, evaluated separately, show weight reduction potential, as described by the literature. Bansal et al. (2011)

showed significant weight reduction of a flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in mice submitted to a high fat diet; Ikeuchi et al. (2007) detected 15 % decrease in body weight gain when administering 30 mg/kg of astaxanthin in mice submitted to a high fat diet; Tsuboyama-Kasaoka et al. (1999) proved the efficiency of a fish oil diet containing 7 % EPA and 24 % DHA, obtaining 58 % decrease in body weight gain after 5 months; Pérez-Matute et al. (2007) showed a 9 % decrease in body weight gain in Wistar rats treated with cafeteria diet and fish oil at 1 g/kg.d during 5 weeks.

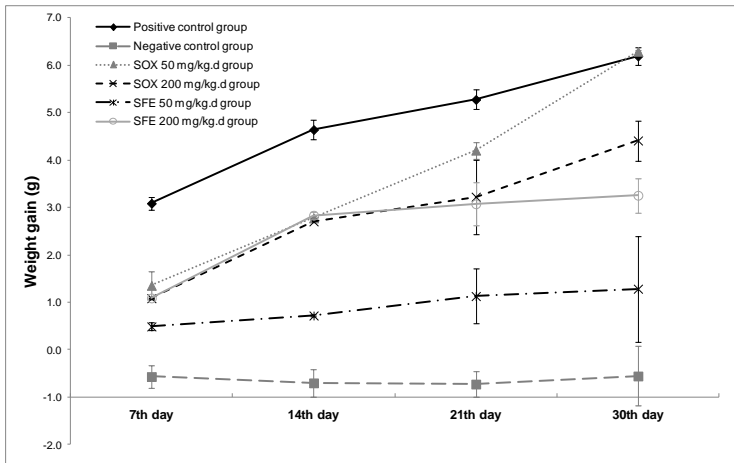


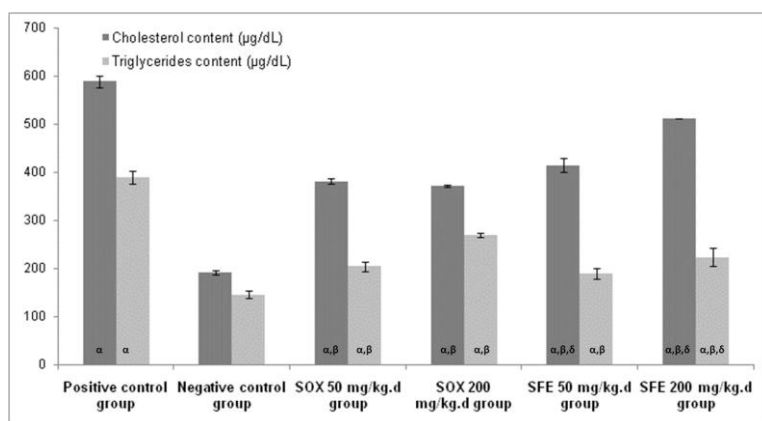
Figure 7.2 Knockout mice' weight gain during the high fat diet treatment time, extraction technique and shrimp extract concentration administered.

Considering the above mentioned effects and comparing the different mice groups and the extraction technique used to obtain the extracts for the diet treatments it is possible to observe the following aspects related to the extraction procedure: the TPC values (SOX: 26.4 ± 0.1 mgGAE/g; SFE: 14 ± 1 mgGAE/g – Figure 7.1) and the astaxanthin content (SOX: 25.6 ± 0.9 μ g/g; SFE: 894 ± 13 μ g/g, results of MEZZOMO et al., 2011a – section 5.3.2.3 of chapter 5 - and section 6.3.5 of chapter 6 of this thesis), are different, while the values for EPA, DHA and %AA (DPPH and β -carotene methods) are statistically similar. Then, taking into account the comparison between SOX and SFE extracts we suggest that the anti-obesity effect observed by the SFE

50 group is caused by a synergistic effect of high content of astaxanthin, associated with the adequated levels of EPA, DHA and flavonoids.

Finally, comparing different extract concentration in a same extraction technique, the concentration of 50 mg/kg.d was more efficient than the 200 mg/kg.d in order to reduce the mice' weight gain for both SFE and SOX methods. In addition, in the treatment final week, we observed 33 % mortality in SFE 200 group, probably caused by extract overdose when administered at 200 mg/kg.d.

The mice' total serum cholesterol and triglycerides levels of different groups after 30-day treatment is illustrated in Figure 7.3.



α = statistically different compared to negative control group; β = statistically different compared to positive control group; δ = statistically different comparing SFE groups with SOX groups, at same concentration

Figure 7.3 Total serum cholesterol and triglyceride levels of different knockout mice groups submitted to 30-day treatment

All the groups treated with shrimp extracts (SOX 50, SOX 200, SFE 50 and SFE 200) showed inferior values of total serum cholesterol and triglycerides levels, compared with the positive control group, indicating the hypolipidemic effect of shrimp residue extracts obtained by both methods (SOX and SFE). Considering the triglyceride level, the SFE 50 group showed the lowest value, statistically equal to SOX 50 group. Comparing the concentrations employed, the most effective one was 50 mg/kg.d, for both extraction methods. In the same way, the cholesterol levels of SOX groups showed the lowest values, statistically equal for both concentrations applied, next to the SFE 50 results.

Studies using chitosan, a polysaccharides primarily derived from the exoskeleton of crustaceans, indicated that its intake have been resulted in lowering obesity and dyslipidemia (BAKER et al., 2009), however the evidence for its beneficial effects is currently weak (LARSEN et al., 2011) and its presence in shrimp residue extracts is probably low due to the extraction procedures applied. Additionally, fucoxantin, a carotenoid from xanthophyl group and structully similar to astaxanthin, have been indicated to reduce obesity by inhibiting intestinal lipase activity (MATSUMOTO et al., 2010), which also can promotes the reduction of plasma triglycerides levels. Moore et al. (2006) studied the influence of oily fish intake on plasma triacylglycerols in overweight men and women and results indicated that two portions of oily fish, rich in DHA and EPA, per week led to significant reductions in triglycerides levels, compared to consumption of the same portion of white fish that not presented significant content of this fatty acids. Olsa et al. (2010), studying the influence of an EPA and DHA nutrition influences on plasma fatty acids composition, cited that feeding the elderly exclusively with an enteral formula enriched with these ω -3 fatty acids improves their plasma lipid fatty acid profile and lowers the triglycerides levels. Finally, the study of Seierstad et al. (2005) proved that the use of diets composed by fish oil rich in EPA and DHA during 6 weeks promoted significant reductions of serum triglycerides, besides other biochemical indicators. Therefore, as already mentioned, the shrimp residue extracts obtained by SOX method presents higher content of phenolics compared to the SFE sample (Figure 7.1). Also, the extract obtained by SFE 50 shows the highest content of astaxanthin (results from section 5.3.2.3 of chapter 6). Then, we suggest that the best effect of cholesterol reduction observed in the mice groups treated with SOX extracts is mainly caused by the high phenolic content whereas the best efficiency on triglycerides reduction, detected by the groups SOX 50 and SFE 50, is mainly due to the presence of astaxanthin associated with DHA, EPA and chitosan, important hypolipidemic agents.

Among the variety of indications for the treatments of hyperlipidemia and obesity, a dietary restriction is the most appropriate (UESHIMA et al., 2004; MARTINS et al., 2010). However, if a diet prescribes an adequate reduction in cholesterol and/or triglyceride intake and does not work, it is necessary to administrate drugs with hypolipidemic and/or anti-obesity activity associated with food restriction (FERREIRA et al., 2011). Therapy with hypolipidemic or anti-obesity agents reduced the rate of atherosclerosis progression and,

in some cases, induced the regression of existing lesions (SCHIEFFER and DREXLER, 2003; UESHIMA et al., 2004; MARTINS et al., 2010). In addition, there are plenty of evidences that hypertriglyceridemia is a risk factor of coronary heart disease, associated with conditions where elevated levels of triglycerides accelerate obesity and atherosclerosis (SCHIAVO et al., 2003). Over the past 30 years, few obesity-treatment drugs have been developed or approved. Only two drugs are currently available, the sibutramine and the orlistat, and some drugs have been withdrawn from the market due to serious side-effects. Sibutramine and orlistat may cause weight loss of up to 10% when used in combination with dietary, behavioral, and exercise therapy (YUN et al., 2010). Otherwise, this drugs acts only in the weight reduction, normally without effects on cholesterol and triglycerides levels. Then, shrimp residue extracts studied in the present work is a novelty as a natural bio-component which combines significant mixed effect as anti-obesity and hypolipidemic agent when using high fat diet, with the environmental importance and appeal due to the use of a processing residue.

7.4 Conclusions

The study of the antioxidant activity from shrimp residue extracts revealed that the highest antioxidant activities, determined by the DPPH and β -carotene methods, were observed in extracts obtained by polar solvents. In addition, among the different supercritical conditions, the extract obtained at 300 bar and 333.15 K presented antioxidant activity by β -carotene bleaching method similar to the low pressure extracts (SOX-Ac, MAC-Ac, MAC-EtOH and SOX-IPA), and also to the BHT standard. The β -carotene bleaching method showed superior antioxidant results compared to the DPPH method, indicating that: the β -carotene system is more sensitive to the chemical characteristics of the shrimp residue extracts (presence of non-polar antioxidant compounds). The unsaturated fatty acids are the main fatty acid group present in the shrimp residue extracts (55 ± 5 % for SOX-EtOH extract and 58 ± 5 % for SFE sample), and the most representative fatty acid is the oleic acid. The shrimp residue extracts showed a high content of eicosapentaenoic and docosahexanoic fatty acids, which have a wide range of proved beneficial effects on human health. The SOX-EtOH and SFE (333.15 K/300 bar) also presented phenolic components, predominant in SOX extract, probably because to the occurrence of the shrimp head in the processed residue that conserves its diet, rich in marine microalgae. The extract obtained by SFE (333.15 K/300 bar), administered at

50 mg/kg.d, showed the best effect on mice weight reduction (79-84 % during all treatment). The mice groups for all extract treatments showed inferior values of total serum cholesterol and triglycerides compared to the positive control group, indicating the hypolipidemic effect of shrimp residue extracts obtained by both extraction methods (SOX and SFE). The best results of reducing triglycerides were obtained by both shrimp residue extracts at 50 mg/kg.d, whereas the SOX extract for both concentrations (50 and 200 mg/kg.d) was most efficient on cholesterol reduction. Increasing the administered concentration from 50 to 200 mg/kg.d, for SOX and SFE extracts, was not efficient to reduce the body weight or the triglyceride levels and it was probably toxic to the mice. Finally, the shrimp residue extracts presented advantages over the known hypolipidemic drugs because it is a natural component, combines significant effects on obesity and dyslipidemia treatments when using high fat diet and, mainly, presents a mixed effect (concomitant reduction of body weight, cholesterol and triglycerides levels). These effects are probably due to a synergistic action of astaxanthin, EPA, DHA and flavonoid content. In addition, the biological use proposed in this work is reinforced by the environmental importance by the use of a processing residue from food industry.

7.5 References

- ABELL, L. L.; LEVY, E. B.; BRODIE, B. B.; Kendall, F. E. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 357-366, 1952.
- ALMEIDA, P. P.; MEZZOMO, N; FERREIRA, S. R. S. Extraction of *Mentha spicata* L. volatile compounds: Evaluation of process parameters and extract composition. **Food and Bioprocess Technology** (Online FirstTM), 2010.
- AMIGUET, V. T.; KRAMP, K. L.; MCRAE, J. M. C.; GOULAH, A.; KIMPE, L. E.; BLAIS, J. M.; ARNASON, J. T. Supercritical carbon dioxide extraction of polyunsaturated fatty acids from Northern shrimp (*Pandalus borealis* Kreyer) processing by-products. **Food Chemistry**, 2011. (*In press*).
- A. O. C. S. - American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society**. Method Ce 1f-96- Determination of Cis- and Trans-Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC, 2002.
- BAKER, W. L.; TERCIUS, A.; ANGLADE, M.; WHITE, C. M.; COLEMAN, C. I. A meta-analysis evaluating the impact of chitosan on serum lipids in hypercholesterolemic patients. **Annals of Nutriyion and Metabolism**, v. 55, p. 368-374, 2009.
- BANSAL, P. ; PAUL, P.; MUDGAL, J.; NAYAK, P. G.; PANNAKAL, S. T.; PRIYADARSINI, K.I.; UNNIKRISHNAN, M.K. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat

diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2011. (*In press*)

BENELLI, P.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 132-140, 2010.

BRUM, A A S.; OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Óleo de pescado como suplemento dietético. **Revista Ciência & Tecnologia**, v.10, n.19, p.71-78, 2002.

BUCOLO, G.; DAVID, H. **Quantitative Determination of Serum Triglycerides by the Use of Enzymes**. *Clinical Chemistry*, v 19, p. 476-482, 1973.

CAMPOS, L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8413-8420, 2008.

COMIM, S. R. R.; MADELLA, K.; OLIVEIRA, J. V.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from dried banana peel (*Musa* spp., genomic group AAB): Extraction yield, mathematical modeling, economical analysis and phase equilibria. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 1, p. 30-37, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations)/WHO (World Health Organization). **Fats and oils in human nutrition**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, 168 pp, 1994.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations. **The state of world fisheries and aquaculture**. FISHSTAT, Rome, 2010.

FAMINO, A. O.; ODUGUWA, O. O.; ONIFADE, A. O.; OLOTUNDE, T. O. Protein quality of shrimp-waste meal. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 1, p. 185-188, 2000.

FERREIRA, E.; GRIS, E.; REBELLO, J.; CORREIA, J.; DE OLIVEIRA, L.; FILHO, D.; PEDROSA, R. C. The 2',4',6'-Trihydroxyacetophenone Isolated from myrcia multiflora has antiobesity and mixed hypolipidemic effects with the reduction of lipid intestinal absorption. *Planta Medica*, p. 571-577, 2011.

FOOD AND DRUG REGULATION. Available in: <http://laws.justice.gc.ca/en/F-27/C.R.C.-c.870/124366.html#rid-12437>, Department of justice, Canada, 2005.

FRIEDMAN, J. M. A War on Obesity, Not the Obese. **Science**, v. 299, p. 856-, 2003.

FRIEDMAN, J. M. Obesity: Causes and control of excess body fat. **Nature**, v. 459, p. 340-342, 2009.

FURUYA, W. M.; HAYASHI, C.; SILVA, A. B. M.; SANTOS JR, O. O.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos do camarão-d'água-doce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1577-1580, 2006.

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

GOTTO, A. M. Introduction. **The American Journal of Cardiology**, v. 71, p. B1-B2, 1993.

GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y.; CHEN, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT**, v. 41, p. 1082–1088, 2008.

- HEO, S.-J.; PARK, E.-J.; LEE, K.-W.; JEON, Y.-J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1613–1623, 2005.
- HU, Q.; HU, Y.; XU, J. Free radical-scavenging activity of Aloe Vera (*Aloe barbadensis Miller*) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, v. 91, p. 85–90, 2005.
- HU, Z.-C.; ZHENG, Y.-O.; WANG, Z.; SHEN, Y.-C. pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 586–590, 2006.
- INHAMUNS, A. J.; FRANCO, M. R. B. EPA and DHA quantification in two species of freshwater fish from Central Amazonia. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 587–591, 2008.
- IKEUCHI, M.; KOYAMA, T.; TAKAHASHI, J.; YAZAWA, K. Effects of astaxanthin in obese mice fed a high-fat diet. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 893–899, 2007.
- JESUS, S. P.; GRIMALDI, R.; HENSE, H. Recovery of γ -oryzanol from rice bran oil byproduct using supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 149–155, 2010.
- KANG, H. J.; CHAWLA, S. P.; JO, C.; KWON, J. H.; BYUN, M. W. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 614–20, 2006.
- KITZBERGER, C. S. G.; LOMONACO, R. H.; MICHIELIN, E. M. A.; DANIELSKI, L.; CORREIA, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of shiitake oil: Curve modeling and extract composition. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 35–43, 2009.
- KITZBERGER, C. S. G.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631–638, 2007.
- KVIECINSKI, M. R.; BENELLI, P.; FELIPE, K. B.; CORREIA, J. F. G.; PICH, C. T.; FERREIRA, S. R. S.; PEDROSA, R. C. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetylenes with antitumor activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 243–248, 2011.
- LA FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, p. 90–95, 2006.
- LARSEN, R.; EILERTSEN, K. E.; ELVEVOLL, E. O. Health benefits of marine foods and ingredients. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 508–518, 2011.
- MACÍAS-SANCHEZ, M. D.; MANTELL, C.; RODRÍGUEZ, M.; LA OSSA, E. M.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O., 2009. Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll from *Dunaliella salina*. **Talanta**, v. 77, n. 3, p. 948–952, 2009.
- MARTINS, F.; NOSO, T. M.; PORTO, V. B.; CURIEL, A.; GAMBERO, A.; BASTOS, D. H. M.; RIBEIRO, M. L.; CARVALHO, P. O. Mate tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat-diet-induced obese mice. **Obesity**, v. 18, p. 42–47, 2010.

- MATSUMOTO, M.; HOSOKAWA, M.; MATSUKAWA, N.; HAGIO, M.; SHINOKI, A.; NISHIMUKAI, M. Suppressive effects of the marine carotenoids, fucoxanthin and fucoxanthinol on triglyceride absorption in lymph duct-cannulated rats. **European Journal of Nutrition**, v. 49, p. 243–249, 2009.
- MATTHÄUS, B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3444–52, 2002.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian Plant extracts for antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical method. **Phytotherapy Research**. v.15, p. 127–130, 2001.
- MEYERS, S. P.; CHEN, H. M. Process for utilization of shellfish waste, **US Patent** 4505936, 1985.
- MEZZOMO, N.; DE PAZ, E.; MARASCHIN, M.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: Effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2012b - **chapter 8 of this thesis (In press)**
- MEZZOMO, N.; MAESTRI, B.; DOS SANTOS, R. L.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue: influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1383–1391, 2011a – **chapter 5 of this thesis**.
- MEZZOMO, N.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Economical viability of SFE from peach almond, spearmint and marigold. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 473–479, 2011b.
- MEZZOMO, N., MARTÍNEZ, J., FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 10–16, 2009.
- MEZZOMO, N.; MILEO, B. R.; FRIEDRICH, M. T.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5622–5632, 2010.
- MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 33, p. 131–138, 2005.
- MOORE, C. S.; BRYANT, S. P.; MISHRA, G. D.; KREBS, J. D.; BROWNING, L. M.; MILLER, G. J.; JEBB, S. A. Oily fish reduces plasma triacylglycerols: a primary prevention study in overweight men and women. **Nutrition**, v. 22, n. 10, p. 1012–1024, 2006.
- OLZA, J.; MESA, M. D.; AGUILERA, C. M.; MORENO-TORRES, R.; JIMÉNEZ, A.; LA CRUZ, A. P.; GIL, A. Influence of an eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid-enriched enteral nutrition formula on plasma fatty acid composition and biomarkers of insulin resistance in the elderly. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 31–37, 2010.
- PASSOTO, J. A.; PENTEADO, M. V. C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante do b-caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 68–72, 1998.
- PÉREZ-MATUTE, P.; PÉREZ-ECHARRI, N.; MARTÍNEZ, J. A.; MARTI, A.; MORENO-ALIAGA, M. J. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin

- resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumor necrosis factor- α . **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 389–398, 2007.
- PESCHEL, W.; SÁNCHEZ-RABANEDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMÉNEZ, D.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; BRUXADERAS, S.; CODINA, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137–150, 2005.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolic in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.
- ROTHWELL, N. J.; SAVILLE, M. E.; STOCK, M. J. Effects of Feeding a “Cafeteria” Diet on Energy Balance and Diet-Induced Thermogenesis in Four Strains of Rat. **Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1515-1524, 1982.
- SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1195-1200, 2005.
- SEIERSTAD, S. L.; SELJEFLØT, I.; JOHANSEN, O.; HANSEN, R.; HAUGEN, M.; ROSENLUND, G. Dietary intake of differently fed salmon; the influence on markers of human atherosclerosis. **European Journal Clinical Investigation**, v. 35, p. 52–59, 2005.
- SHAHIDI, F.; MIRALIAKBARI, H. Omega-3 (n-3) fatty acids in health and disease: Part 1 – Cardiovascular disease and cancer. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 4, p. 387–401, 2004.
- SHAHIDI, F.; MIRALIAKBARI, H. Omega-3 fatty acids in health and disease: Part 2 – Health effects of omega-3 fatty acids in autoimmune diseases, mental health, and gene expression. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 2, p. 133–148, 2005.
- SHIMIDZU, N.; GOTO, M.; MIKI, W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. **Fisheries Science**, v. 62, n. 1, p. 134-137, 1996.
- SIMOPOULOS, A. P. Omega-3 fatty acids and athletics. **Current Sports Medicine Reports**, v. 6, n. 4, p. 230–236, 2007.
- SINGH, B. K.; MEHTA, J. L. Management of dyslipidemia in the primary prevention of coronary heart disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 17, n. 5, p. 503-511, 2002.
- SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J. R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica e Laboratorial**, v. 39, p. 283-288, 2003.
- SHIEFFER, B.; DREXLER, H. Role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme inhibitors, cyclo-oxygenase-2 inhibitors, and aspirin in anti-inflammatory and immunomodulatory treatment of cardiovascular diseases. **American Journal of Cardiology**, v. 91, p. 12H-18H, 2003.
- SUN, L.; SANGKATUMVONG, S.; SHUNG, K.K. A high resolution digital ultrasound system for imaging of zebrafish. **IEEE Ultrason Symposium**, p. 2202–2205, 2006.
- TAKAHASHI, O.; HIRAGA, K. Dose-response study of hemorrhagic death by dietary butylated hydroxytoluene (BHT) in male rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 43, n. 2, p. 399-406, 1978.
- TIERNEY, M. S.; CROFT, A. K.; HAYES, M. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. **Botanica Marina**, v. 53, p. 387–408, 2010.

- TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; KIM, H.; EZAKI, O. Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, p. 879–885, 1999.
- UESHIMA, K.; AKIHISA-UMENO, H.; NAGAYOSHI, A.; TAKAHURA, S.; MATSUO, M.; MUTOH, S. A gastrointestinal lipase inhibitor reduces progression of atherosclerosis in mice fed a western-type diet. **European Journal of Pharmacology**, v. 501, p. 137-142, 2004.
- VINSON, J. A.; SU, S. H.; ZUBIK, I.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 5315–5321, 2001.
- WEINHOLD, T. S.; BRESCIANI, L. F. V.; TRIDAPALLI, C. W.; YUNES, R. A.; HENSE, H.; FERREIRA, S. R. S. *Polygala cyparissias* oleoresin: Comparing CO₂ and classical organic solvent extractions. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 109-117, 2008.
- WITSCHI, H.; LOCK, S. Toxicity of butylated hydroxytoluene in mouse following oral administration. **Toxicology**, v. 9, n.1-2, p. 137-146, 1978.
- WOO, M. N.; BOK, S. H.; LEE, M. K.; KIM, H. J.; JEON, S. M.; DO, G. M.; SHIN, S. K.; HA, T. Y.; CHOI, S. Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of a Proprietary Herb and Fiber Combination (S&S PWH) in Rats Fed High-Fat Diets. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 169-, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Fact sheet: obesity and overweight**. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html>.
- YUN, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1625–1641, 2010.
- ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M. A. A. Standardized low-cost batch SFE Units for University education and comparative research. **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, v. 1, p. 577, 2003.

CAPÍTULO 8: ENCAPSULAMENTO DE EXTRATO DO RESÍDUO DE CAMARÃO ROSA

Este capítulo descreve o trabalho realizado em estágio de doutorado (PDEE/Capes nº 1498/10-0) na Universidad de Valladolid (Valladolid/España), o qual considerou o estudo de co-precipitação do extrato de camarão rosa em polímero utilizando CO₂ como anti-solvente. O estudo descrito atende ao seguinte objetivo específico da presente tese (seção 1.2): avaliar a eficiência do processo de co-precipitação/ encapsulamento do extrato de resíduo de camarão em polímeros empregando CO₂ como anti-solvente.

A matéria-prima utilizada foi obtida no mercado público de Florianópolis/SC/Brasil e submetida a tratamento térmico, secagem e moagem, e o método de extração empregado foi a maceração com acetona, de acordo com os resultados do capítulo 5. A seguir, foi realizada a co-precipitação de astaxantina em polímeros por tecnologia supercrítica utilizando CO₂ como anti-solvente pelos métodos de SAS e SAS de emulsão (SFEE), onde foi investigando o efeito de variáveis do processo (pressão, temperatura, vazão de solução e tamanho da unidade de precipitação) no tamanho, distribuição do tamanho, na morfologia das partículas precipitadas, na eficiência de encapsulamento de carotenóides e na estabilidade dos encapsulados. A eficiência do encapsulamento do extrato em Pluronic F127 através de SAS foi de até 74 %. Nano-emulsões processadas por SFEE apresentaram o melhor desempenho de encapsulamento e o menor tamanho de partícula. Todas as partículas produzidas por SAS e SFEE apresentaram melhor preservação de cor que o extrato não processado.

Na sequência está mostrado o trabalho completo realizado neste capítulo, no formato de artigo e no idioma inglês, exigido pelos periódicos internacionais de alto impacto da área como o Journal of Supercritical Fluids o qual aceitou este trabalho para publicação *.

* *Artigo aceito para publicação no Journal of Supercritical Fluids (DOI: 10.1016/j.supflu.2011.08.006)*

Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: effect of operational conditions on encapsulation efficiency

ABSTRACT

Active principles of a drug can be encapsulated through polymers in order to prevent adverse reactions and protect its properties. The aim of this work was the use of the Supercritical Anti-Solvent (SAS) process to co-precipitate shrimp residue extract and polymer. The shrimp residue was pre-treated and macerated with acetone, producing the carotenoid extract. The effect of the operating parameters of the SAS precipitation was performed in small and large scale units, using Pluronic F127. The Supercritical Fluid Extraction of an Emulsion (SFEE) was also applied for the co-precipitation using modified starch. The encapsulation performance was evaluated by morphology and particle size, efficiency of astaxanthin encapsulation and color stability. It was possible to microprecipitate the carotenoid extract with Pluronic F127 by SAS, with an encapsulation efficiency of up to 74 %. Nano-emulsion produced by SFEE presented the highest encapsulation performance and the lowest particle size. All particles produced by SAS and by SFEE obtained better color preservation compared to the crude extract.

Keywords: stability, astaxanthin, scale up, Pluronic, modified starch.

8.1 Introduction

The hazard attributed to synthetic food additives in human health is conducting to their replacement by natural products. In this context, the use of carotenoids, natural pigments responsible for the red, orange and yellow color of many vegetables and other foods has an increasing industrial interest. Some of the most abundant carotenoids present in the human organism are β -carotene, lycopene, astaxanthin and lutein. These substances are not produced by the human body, and therefore must be supplied by the human diet (MIGUEL et al., 2008). Besides their use as pigments, carotenoids have several pharmaceutical and nutritional applications due to their positive effect on health such as the antioxidant potential (GRANADO et al., 2003; BURTON, 1989). The products supplied to pharmaceutical and food industries are usually presented as a mixture of the carotenoid and a biopolymer (encapsulated product), since this formulation facilitates the handling of the product

and improves its stability (McCLAIN and BAUSCH; MIGUEL et al., 2008).

The use of pink shrimp residue, obtained from the processing of the shrimp species such as *P. brasiliensis* and *P. paulensis*, is an alternative for the recovery of the carotenoid fraction present in the industrial waste. Therefore, carotenoids enriched extracts can be obtained by several extraction procedures and different pre-treatments applied to the raw material, as extensively studied by Mezzomo et al. (2011) (chapter 5). The authors compared the efficiency of different extraction methods and evaluated the technical viability of the process according to the content of astaxanthin, the most representative carotenoid from crustaceans like shrimp.

Because astaxanthins are easily altered in the presence of light, oxygen or high temperatures (GOUVEIA et al., 2007), it is important to define adequate procedures or formulations that preserve the quality of carotenoid enriched extracts against their oxidation. Different procedures are applied to chemical formulations in order to protect their characteristics, such as microencapsulation. The encapsulation consists of coating the active components, like carotenoid enriched extract, by means of a protective film, such as a polymer cover. Therefore, the main advantages of the encapsulation are: reduces the evaporation of the active extract, increases its shelf life and controls the release through the coating film, which may increase its biological efficiency (MARTÍN et al., 2010).

For natural products encapsulation, important for food and pharmaceutical industries, the coating film (carrier or shell material) must be biodegradable and non-toxic. Co-polymers of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO), commercially known as Pluronic, are water soluble and exhibit low toxicity, especially in low concentrations (less than 10,000 mg/day.kg_{rats}) (BASF, 2004). Certain classes of Pluronic polymers, ordered according to their molecular weights, have been approved by Food and Drug Administration (FDA), such as Pluronic F127, which presents molecular weight of 12,600 g/mol (BASF, 2004; KHATTAK, 2005). Furthermore, Pluronic F127 presents relevant physical properties such as water permeability and hydrophilicity that empower the coating layer with the characteristic of slowly release the encapsulated material (STRAPPE et al., 2005).

The traditional encapsulation techniques are: solvent evaporation, phase separation and spray drying. These methods require relatively

high temperatures, which can be inadequate for preserving the stability of a heat sensitive substance like the carotenoid compounds (active principle). Hence, alternative operations such as high-pressure technology allow the production of particulated materials (powders) which conserve the quality of the active component, a performance difficult to achieve by the traditional techniques (MIGUEL et al., 2008; VARONA et al., 2010).

Likewise, starches have also been used as coating material for encapsulation processes where the biodegradability and the food grade usage are relevant aspects. Hi-Cap 100, for instance, is an n-octenyl succinic anhydride (OSA)-modified starch, derived from waxy maize and especially suitable for the encapsulation of flavors, vitamins and spices. Because of the production of highly viscous solution when it is solubilized in water, this material is characterized by excellent resistance to oxidation, adequate to protect labile substances (NATIONAL STARCH FOOD INNOVATION, 2011).

The production of ultra-fine particles through supercritical anti-solvent has several advantages compared to other traditional precipitation methods, such as spray drying. The mixing between the supercritical anti-solvent and the liquid phase, containing the substance for encapsulation, is much faster than the conventional low pressure processes, which leads to higher super saturations and smaller particle diameters. The supercritical anti-solvent can be easily and totally removed from the final product by pressure reduction, in contrast with the complex purification methods often required when organic anti-solvents are used. Furthermore, a proper selection of the anti-solvent, for instance, supercritical carbon dioxide (SC-CO₂), enables the process to be carried out at near ambient temperatures and inert atmosphere, avoiding thermal degradation or oxidation of the product. For these reasons, supercritical anti-solvent processes have been increasingly studied during the last years for several different applications, which include explosives, polymers, pigments, pharmaceuticals and natural compounds (COCERO and FERRERO, 2002; MIGUEL et al., 2006; MIGUEL et al., 2008). Therefore, supercritical anti-solvent (SAS) process is a very convenient method that covers several viability requirements.

A new promising technology to produce nanometer particles from natural substances is represented by the use of supercritical fluids in combination with nano-emulsions, which presents advantages over these two separated assets. The combined process is named Supercritical

Fluid Extraction of Emulsions (SFEE) (SHEKUNOV et al., 2006) and consists in extracting the organic solvent from the droplets of an oil-in-water emulsion by using SC-CO₂. If a solute is dissolved in the organic solvent, each droplet of this solution can be considered as a small Gas Anti-solvent precipitator. This is explained because the saturation of each droplet with the supercritical fluid promotes the organic solvent extraction by the gas phase, resulting in the solute precipitation. An interesting advantage of the SFEE is that, theoretically, the product particle size can be modified by controlling the geometric characteristics of the emulsion phases (MATTEA et al., 2009).

To the best of our knowledge, the precipitation study involving the extract from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue has not been previously reported in the literature. Moreover, previous researches related to the precipitation of complex mixtures derived from natural products are also scarce. Therefore, the focus of this study was related to the use of high pressure method for the encapsulation of extracts enriched in astaxanthin, the carotenoids representative from crustaceans. Following this objective, the aim of this work was the investigation of the operational conditions of the SAS process, applied for the co-precipitation of the extract of shrimp residue and the polymer Pluronic F127. Progressively, the SFEE process was also applied by replacing Pluronic F127 for the modified starch Hi-Cap 100. The literature data related to the precipitation of other carotenoids (COCERO and FERRERO, 2002; MIGUEL et al., 2006; MIGUEL et al., 2008), different from astaxanthin, were applied for the selection of the adequate process conditions.

8.2 Material and Methods

8.2.1 Raw material preparation and extraction procedure

The raw material consists of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue (waste from shrimp processing), composed essentially by head, carapace, and tail. The residue was provided by *Peixaria Nelson Santos* (Florianópolis, Santa Catarina, southern Brazil), sited at the local public market. The raw material was obtained from the unpeeling of the cultivated shrimp, collected in May 2010, representing the high production season of the region. The shrimp residue was pre-treated by combining the process of heat treatment, drying and milling, as designed by Mezzomo et al. (2011) (results from section 5.2.). After the pre-treatment, the raw material was submitted to the extraction of the carotenoid enriched fraction, which consists in a

cold maceration in acetone (P.A., Nuclear, CAQ Ind. e Com. LTDA.) for 5 days at room temperature. According to the literature data, the cold maceration in acetone of the pink shrimp residue provides an extraction yield of 4 ± 1 % (w/w, d.b.) and the resulting extract contains an astaxanthin amount of 252 ± 6 $\mu\text{g}/\text{g}_{\text{extract}}$ (MEZZOMO et al., 2011) (results from section 5.3.2.3).

8.2.2 Encapsulation processes

The encapsulation of the shrimp extract in polymer was performed through two different SAS units, as detailed in sections 2.2.1 and 2.2.2. The effect of the precipitation conditions of pressure (80, 100 and 120 bar), temperature (308.15, 313.15 and 318.15 K), solution flow rate (1.0, 2.0 and 3.0 mL/min) and extract concentration on feed solution (2.0, 6.0 and 12.0 mg/mL) was evaluated by the small scale unit. The primary solvent used in the feed solution was acetone P.A. due to the high solubility of the extract and polymer. Among the 16 assays performed in small scale, four experimental conditions were selected for the large scale process based on the results presented in section 3.1. The large scale assays were performed by reproducing the conditions carried out in small scale and taking into account a scale up criteria, between small and large scales, of: 4 and 5 times the flow rates of CO₂ and the solution. The polymer used for all SAS experiments in small and in large scales was the Pluronic F127 in a concentration in the feed solution of 10.0 mg_{polymer}/mL. The operational conditions applied for the SAS assays are reported in Table 8.1. Some assays described in Table 8.1 are in same operational conditions, in order to evaluate the process repeatability.

8.2.2.1 Supercritical Anti-Solvent (SAS) in small scale

The precipitator cell used to perform the SAS process in the small scale unit consisted of a chamber assembled in AISI 316 stainless steel. Details of SAS small scale unit and its operational procedure are detailed in section 3.7.1.

8.2.2.2 Supercritical Anti-Solvent (SAS) in large scale

A schematic diagram of the pilot plant and the details of the experimental procedure used for the semi continuous SAS process are presented by Miguel et al. (2008). Details of SAS small scale unit and its operational procedure are detailed in section 3.7.2.

Table 8.1. Operational conditions and efficiency on astaxanthin encapsulation of Supercritical Anti-Solvent (SAS) and SAS from an emulsion (SFEE) experiments

Precipitator unit	Pressure (bar)	Temperature (K)	CO ₂ flow rate (kg/h)	Solution flow rate (mL/min)	Extract concentration (mg/mL)	Astaxanthin encapsulation efficiency (%) ¹
SAS Small	100	313.15	1.0	1.0	2.0	
SAS Small	100	313.15	1.0	1.0	2.0	52 ± 2 ^c
SAS Small	100	313.15	1.0	1.0	2.0	
SAS Small	100	313.15	1.0	1.0	6.0	
SAS Small	100	313.15	1.0	1.0	6.0	46 ± 3 ^{de}
SAS Small	100	313.15	1.0	1.0	6.0	
SAS Small	100	313.15	1.0	2.0	6.0	19.7 ± 0.2 ^a
SAS Small	100	313.15	1.0	3.0	6.0	23 ± 1 ^a
SAS Small	120	313.15	1.0	1.0	6.0	31.2 ± 0.5 ^b
SAS Small	80	313.15	1.0	1.0	6.0	35.8 ± 0.9 ^c
SAS Small	100	318.15	1.0	1.0	6.0	31 ± 2 ^b
SAS Small	100	308.15	1.0	1.0	6.0	71 ± 2 ^{fg}
SAS Small	120	308.15	1.0	1.0	6.0	42 ± 2 ^d
SAS Small	80	308.15	1.0	1.0	6.0	47.2 ± 0.7 ^{de}
SAS Small	120	308.15	1.0	1.0	12.0	26 ± 2 ^a
SAS Small	100	313.15	1.0	1.0	12.0	74 ± 4 ^{fg}
SAS Large	100	313.15	4.0	4.0	6.0	
SAS Large	100	313.15	4.0	4.0	6.0	62.5 ± 0.2 ^f
SAS Large	100	308.15	4.0	4.0	6.0	69 ± 5 ^{fg}
SAS Large	100	313.15	4.0	4.0	12.0	68 ± 2 ^{fg}
SAS Large	100	313.15	5.0	5.0	6.0	65 ± 5 ^f
SFEE Large	100	313.15	4.0	4.0	9.6	93.1 ± 0.3 ^h

¹Same superscript letter on same column indicate no significant difference (p < 0.05).

8.2.2.3 Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE)

The SAS process applied to an emulsion is based on the same principles as the Gas Anti-solvent (GAS) process but in a semi-continuous operation. For this process, the emulsion and the anti-solvent fluid are injected into the precipitation vessel continuously, their mixture produces the super saturation of the dispersed phase and the particles are formed. This phenomenon was adequately described by Mattea et al. (2009).

Briefly, oil-in-water emulsions were obtained by means of a three-step process: (1) a surfactant suspension was initially prepared by dispersing the modified starch in deionized water (Milli-Q, Millipore) with the aid of a magnetic stirrer; (2) afterwards, shrimp residue extract was dissolved in dichloromethane and the solution formed was gradually added to the suspension, described previously, under continuous agitation for 5 min to obtain the crude mixture; (3) the

dispersed crude emulsion was then fed into the rotor-stator machine (IKA® LABOR PILOT 2000/4), with 200 mL capacity, and processed during 2 min at 70,000 rpm for fine emulsification. The system was refrigerated through circulating ethylene glycol inside the jacket rotor-stator, which removes the heat generated by the equipment, conferring operating temperatures between 288.15 and 290.15 K.

The SFEE experiments were performed in a large scale unit by changing the position of the inlet and the outlet connections of the precipitation vessel. Preliminary tests indicated that the emulsion formed by Pluronic F127 and shrimp residue extract was not stable, probably due to inadequate solubility of the continuous (aqueous surfactant solution) and the dispersed (extract) phases, or to an inappropriate value of the Hydrophilic - Lipophilic Balance (HLB) from Pluronic F127, which is related to the stability power in the emulsification process. Therefore, a modified starch (Hi-Cap 100) water solution ($2.4 \text{ mg}_{\text{starch}}/\text{mL}_{\text{water}}$) was used to replace the Pluronic F127 and form the continuous phase. The shrimp residue extract was solubilized in dichloromethane, at $9.6 \text{ mg}_{\text{extract}}/\text{mL}$, to form the dispersed phase. The operational conditions of SFEE were: 100 bar, 313.15 K, $4.0 \text{ kg}_{\text{CO}_2}/\text{h}$, $4.0 \text{ mL}_{\text{emul}}/\text{min}$. For details of the SFEE procedure, please see section 3.7.3.

8.2.3 Particle morphology and size

8.2.3.1 Scanning electronic microscopy (SEM)

Samples of the powder collected from the precipitators (SAS assays) were analyzed by a scanning electronic microscope (SEM) model JSM-820, JEOL. A gold sputter was used to cover the samples with a thin layer of gold to allow the light reflection for particle evaluation. The mean particle size was measured by ZEISS image analysis software. In the case of SFEE assay, the suspension obtained was spray dried (MM-Basic-PSR, Mobile MinorTM) and the resulting particles were analyzed by SEM as previously described. The measurements were performed in quadruplicate for each sample.

8.2.3.2 Emulsion droplet and suspension particle size distribution

The emulsion droplet and suspension particle size distribution were measured with a dynamic light scattering instrument (Autosizer Lo-C, Malvern Instruments Ltd.). This instrument is equipped with a 4 mW diode laser (λ : 670 nm) and it was configured to measure the particles sizes ranging from 0.02 to 10 μm . Particle size distribution was

performed for the initial emulsion and also for the suspension obtained by SFEE. This analytical procedure was performed in triplicate for each sample.

8.2.4 Interaction between polymers and encapsulated extract

Differential scanning calorimetry (DSC) is a thermo analytical technique applied to the precipitated samples in order to observe the degree of encapsulation of the shrimp extract inside the polymer. Particularly for the precipitated samples, the DSC analysis gives information about the interaction between the carrier (polymer) and the encapsulated material, and also about the crystallinity of the substances, compared to a standard sample (pure polymer), as discussed by Cocero et al. (2009). In the present work, the DSC profiles were performed for the precipitated samples obtained by the following procedures: SAS in small scale at 100 bar, 313.15 K, 1:1 (kg_{CO₂}/h)/(mL_{sol}/min) and 2.0 mg_{extrac}/mL; SAS in small and large scales (4 and 5 times criteria) at 100 bar, 313.15 K, 1:1 (kg_{CO₂}/h)/(mL_{sol}/min) and 6.0 mg_{extrac}/mL; SAS in small scale at 100 bar, 308.15 K, 1:1 (kg_{CO₂}/h)/(mL_{sol}/min) and 6.0 mg_{extrac}/mL. The differential scanning calorimeter DSC 822e Mettler Toledo SAE was used for this investigation at the conditions of: heating rate of 10 K/min and temperature range from 303.15 K to 503.15 K.

8.2.5 Efficiency on astaxanthin encapsulation

The precipitated samples were previously (24 h before HPLC analysis) homogenized in distilled water in order to release the carotenoid fraction and they were stored at 5 °C until quantification analysis. The quantification analysis was conducted firstly homogenizing the crude extract and the precipitated samples (pre-prepared as described) in *n*-hexane (2 mL) and the resulting solution was centrifuged at 3000 *g* during 5 min. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), according to procedure described in section 3.6.1. Efficiencies of astaxanthin encapsulation were calculated by the ratio between astaxanthin content inside the particles produced by the co-precipitation and the theoretical amount of astaxanthin. The latest value represents the total astaxanthin content injected in the precipitator vessel, equivalent to 100 % of encapsulation efficiency. The values of encapsulation efficiency were statistically evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA), using the statistical package Statistica for Windows 6.0 (Statsoft Inc., USA). The significant differences at level of 5 % were analyzed by

Tukey test.

8.2.6 Color stability of the encapsulated products

The encapsulation effect on the color stability of the shrimp extract was conducted for the precipitated samples obtained by the large scale procedures (SAS and SFEE). The samples submitted to the stability analysis followed the procedure described by Gradinaru et al. (2003). A visible scanning was realized in order to determine the maximum absorbance range on wave length associated to the carotenoid class, a spectra region between 430 and 470 nm. Briefly, the crude extract and the precipitated particles were dissolved in distilled water at concentrations where the initial absorbance lays between 0.8 and 1.0. Then, the samples were maintained at room temperature under natural atmosphere and light exposure to induce the carotenoid degradation. This analysis was performed in triplicate by means of monitoring the degradation by periodic absorbance measurements during 7 days of exposure, using a UV-Visible spectrophotometer (U-2000, Hitachi). The results were expressed in percentages of color conservation, comparing with the initial absorbance data, against time of exposure.

8.3 Results and Discussion

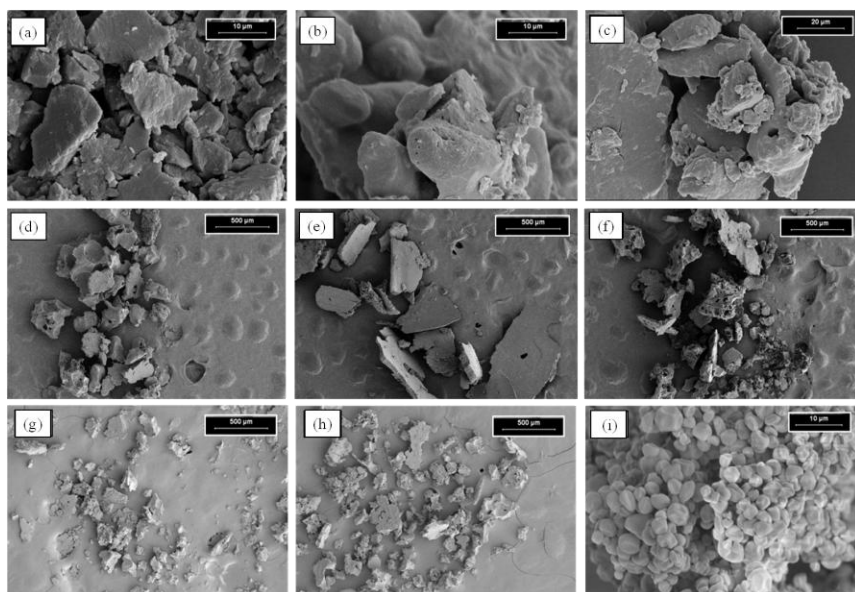
8.3.1 Particles morphology and size

Some of the scanning electronic microscopy (SEM) results of the precipitated particles obtained by SAS-small scale, at various conditions, and by SFEE are presented in Figure 8.1.

The particles precipitated in the small unit were shapeless and presented micrometric size, larger than 1 μm . The effect of SAS pressure indicated that, above 80 bar, the particle size was reduced and the size uniformity enhanced. Otherwise, film formation was observed at: (1) temperatures above 303.15 K, caused by the supercritical CO₂ effect, which reduces polymer melting point; (2) extract concentration in feed solution larger than 6 mg_{extract}/mL, due to the high fat content that enhances the particle agglomeration; (3) feed solution flow rate over 1 mL_{sol}/min, which exceeds the CO₂ capacity to solubilize the organic solvent.

The microscopy results for the samples obtained by the large scale (4 times criterion) assays show: a) particle characteristics (shapeless) similar to small scale samples, obtained at the same precipitating conditions; b) size distribution and the particle sizes smaller for the 4 times scale up samples, compared to the small scale ones, obtained at

the same precipitated condition. Finally, for the 5 times scale up assay, the samples visually form a slighter film compared to the other samples obtained at the same condition (small scale and 4 times scale up). This behavior was confirmed by the SEM data, where no separation among particles was detected for the 5 times scale up samples. This performance was probably caused by the restricted space of the vessel (encapsulation chamber) to contain the high CO₂ and solution flow rates for the 5 times scale up assay.



(a) SAS at 100 bar, 313.15 K, 1.0 mL/min, 2.0 mg/mL; (b) SAS at 100 bar, 313.15 K, 1.0 mL/min, 6.0 mg/mL; (c) SAS at 100 bar, 313.15 K, 2.0 mL/min, 6.0 mg/mL; (d) 120 bar, 313.15 K, 1.0 mL/min, 6.0 mg/mL; (e) SAS at 100 bar, 318.15 K, 1.0 mL/min, 6.0 mg/mL; (f) SAS at 100 bar, 308.15 K, 1.0 mL/min, 6.0 mg/mL; (g) SAS at 120 bar, 308.15 K, 1.0 mL/min, 6.0 mg/mL; (h) SAS at 80 bar, 308.15 K, 1.0 mL/min, 6.0 mg/mL; (i) SFEE at 100 bar, 313.15 K, 4.0 mL/min, 2.4 mg/mL.

Figure 8.1 Scanning Electronic Microscopy of precipitated samples in SAS small scale and SFEE large scale

The SEM results presented in Figure 8.1 show that the SAS procedure was adequate to produce microparticles (above 1 µm), for all conditions evaluated. Therefore, in order to reduce the size of the formed particles, the SFEE procedure was applied using Hi-Cap 100 as surfactant, which enables the formation of stable nano-emulsion, with

$0.68 \pm 0.03 \mu\text{m}$ of droplet size. After the SFEE procedure, a suspension with particles size of $0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ was achieved, which was submitted to spray-drying. The SEM result for the dried suspension is presented in Figure 8.1(i), which shows spherical particles with particle size between 0.8 and $7.0 \mu\text{m}$. The increase in the particle size during spray-drying is due to the precipitation of starch over the previously formed particles of extract.

8.3.2 Interaction between polymer and encapsulated extract

The DSC results give an indication about the efficiency of the co-precipitation, suggesting when the procedure is effective to incorporate the active substance (shrimp extract) inside the carrier matrix (polymer). The co-precipitation efficient is confirmed by the absence of the crystalline and the melting peaks of the active substance, which are normally observed when the component is not coated. Otherwise, the inefficiency of the process, also observed by the DSC data, produces segregated particles of both substances separately (the active extract and the polymer). This behavior is expressed by the DSC graphs by means of a resolution of the peaks that represent the extract and the polymer, as discussed by Cocero et al. (2009).

The DSC results of this work indicated one band at near 333.15 K, for all samples analyzed, as presented in Figure 8.2. These peaks are related to polymer melting point, according to the curve of pure polymer in Figure 8.2. Small scale samples also showed a short band at 363.15 K, most probably indicating melting point of fatty acids fraction from the extract. Then, these results suggest that the small scale assays could produce composites whereas large scale effectively generated encapsulated materials.

8.3.3 Efficiency on astaxanthin encapsulation

The encapsulation efficiencies, at different operational conditions, were determined based on the astaxanthin content and according to the procedure described in section 2.5, detected before and after the precipitation. The results are presented in Table 8.1 for all methods and conditions studied.

The results from Table 8.1 show an evident effect of the pressure level at the encapsulation efficiency, as expressed by data at constant temperature (at 308.15 and at 313.15 K): (a) increasing the pressure from 80 to 100 bar enhances the astaxanthin encapsulation, i.e., from $47.2 \pm 0.7 \%$ to $71 \pm 2 \%$ at 308.15 K; (b) otherwise, raising the pressure

from 100 to 120 bar diminished the encapsulation efficiency, from $46 \pm 3\%$ to $31.2 \pm 0.5\%$ at 313.15 K. The optimal encapsulation condition is related to the thermodynamic properties of the coating material and the active compound, such as the melting point (FRANCESCHI et al., 2008; COCERO et al., 2010). La Fuente et al. (2006) studied the effect of temperature (313.15-333.15 K) and pressure (100-420 bar) on the solubility of astaxanthin in supercritical CO₂ and concluded that it is directly proportional to the increase of both operational parameters. Consequently, based on these literature data it is expected that the best condition to precipitate shrimp residue extract is at lower pressure, because the extract is rich in astaxanthin, as presented by Mezzomo et al. (2011) (section 5.3.2.3 of chapter 5). In contrast, preliminary precipitation tests performed using Pluronic F127 indicated that this polymer requires higher pressure levels (among the pressure conditions studied in this work) to avoid film formation, and then producing only particles during precipitation. Therefore, combining the pressure effect on shrimp residue extract (low pressure) and on Pluronic F127 (high pressure) for their co-precipitation, best encapsulation efficiency was then observed at the intermediate pressure (100 bar).

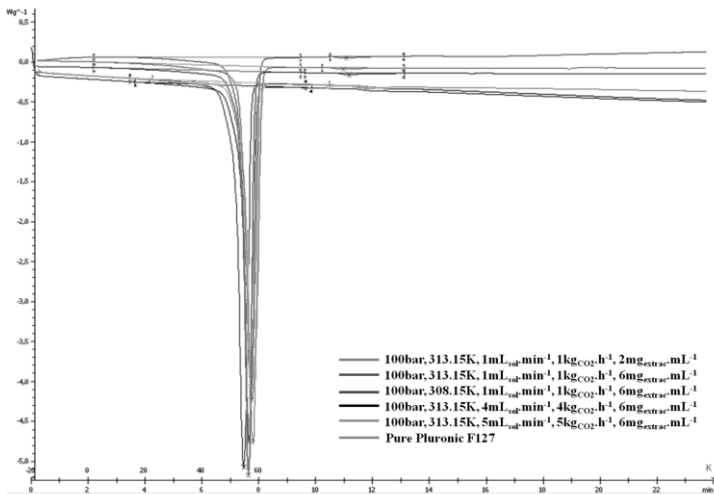


Figure 8.2 Differential scanning calorimetry for pure polymer and precipitated samples by SAS in small and in large scales.

The temperature effect on the encapsulation process (co-precipitation of shrimp residue extract and Pluronic F127) was also noticeable by the efficiency results present in Table 8.1. The increase in encapsulation efficiencies with the temperature decrease (from 318.15 to 308.15 K) was statistically significant at level of 5 %. This behavior was probably caused by the reduction in astaxanthin solubility in supercritical CO₂ with decreasing temperatures (LA FUENTE et al., 2006), probably due to the decrease in astaxanthin vapor pressure. Additionally, low temperatures result in higher distance to the polymer melting point, in this case between 326.15 and 330.15 K (BASF, 2004), improving its precipitation efficiency.

Finally, the influence of the ratio between solution and CO₂ flow rates in the encapsulation efficiency (Table 8.1) was also detected. The results indicate that increasing the flow rate ratio solution/CO₂, the encapsulation effectiveness decreases. This fact is probably because of the high amount of organic solvent compared to the amount of CO₂, perhaps exceeding the CO₂ saturation limit and obstructing the particle formation.

Comparing the small scale assays with large scale ones, it can be observed that when a 4 times scale up criterion was applied (related to CO₂ and solvent flow rates, as explained in section 2.2), the efficiencies on astaxanthin encapsulation were equal or increased in the large scale assays (Table 8.1). The efficiency of the astaxanthin encapsulation is dependent on the particle morphology and size. As observed in section 3.3, smaller particles and higher uniformity were observed for the 4 times large scale assays, compared to the small scale, contributing for the encapsulation efficiency. This behavior could be justified by the higher surface area, for smaller particles, and also by the larger vessel space, enhancing the contact between phases (extract and polymer). Otherwise, comparing the 5 times with the 4 times scale up criterion, no difference in astaxanthin encapsulation was statistically detected. In addition, comparing encapsulation efficiency results with data of particle morphology and size, same better scale up results were found for the 4 times criterion, compared to the 5 times one (section 3.1).

Considering the dimensions of the precipitation cells, the scale up assays were obtained by increasing 4 times the cell height and 2.6 times the cell diameter, compared to the cell used in the small scale experiments. Indeed, considering the scale up results for particle morphology (section 3.1), we detected that smaller particles without film formation (better results) were obtained for the 4 times scale up,

compared to the 5 times scale up, which uses higher CO₂ and solution flow rates compared to the previous one. As a consequence, for the precipitator cell (0.405 m height) used for the scale up experiments, the 4 times criterion was limiting for an efficient encapsulation. Therefore, in order to obtain upper scales for the encapsulation (higher than 4 times) it is necessary to combine the increase in CO₂ and the solution flow rates with the enhancement in the vessel height and volume.

Finally, comparing encapsulation efficiency of SFEE process with the SAS method obtained at approximately the same operating conditions (100 bar, 313.15 K, 6 and 12 mg_{extract}/mL), the SFEE technology achieved the statistically highest encapsulation efficiency (93.1 ± 0.3 % - Table 8.1), which can be considered a high encapsulation efficiency according to literature (VARONA et al., 2010; IMSANGUAN et al., 2010; LIAU et al., 2010). The effectiveness of SFEE on astaxanthin encapsulation from shrimp residue extract can be associated to several parameters, such as polymer type, extract concentration and emulsion formation. Subsequently, further investigation could be an interesting alternative to evaluate the influence of SFEE operational conditions and the polymer types, applied for the co-precipitation of shrimp residue extracts.

8.3.4 Color stability of the encapsulated products

The color conservation of the encapsulated material was evaluated for the samples obtained by SFEE and by SAS in large scale unit because, according to previous results, the scale up enhances the particle quality (morphology, size and encapsulation efficiency). The results, expressed in terms of color conservation by spectrophotometer analysis (as detailed in section 2.6) are presented in Figure 8.3.

According to the data from Figure 8.3, all encapsulated extract presented higher color conservation compared to the crude extract, confirming the protective effect of the SAS and SFEE encapsulation processes. The treated samples also shown a period without color loss in the first 24 hours of exposure, relative to the carotenoid controlled release by the Pluronic F127 (STRAPPE et al., 2005). Additionally, the best particle characterization results were obtained by SAS at 100 bar, 313.15 K, 4 kgCO₂/h, 4 mL_{sol}/min and 6 mg_{extract}/mL and by SFEE (Figure 8.3). These treatments presented high color protection probably due to the effective encapsulation and particle formation, as demonstrated by SEM and DSC results. Hereafter, good color stability was also observed by samples acquired by SAS at higher extract

concentration ($12 \text{ mg}_{\text{extract}}/\text{mL}$ at 313.15 K) and lower temperature (308.13 K with $6 \text{ mg}_{\text{extract}}/\text{mL}$), both treatments at 100 bar , $4 \text{ kg}_{\text{CO}_2}/\text{h}$ and $4 \text{ mL}_{\text{sol}}/\text{min}$. Otherwise, the worse result for color conservation, similar to the value obtained for the crude extract (Figure 8.3), was achieved by SAS at 100 bar , 313.15 K and $6 \text{ mg}_{\text{extract}}/\text{mL}$, in a process using a 5 times scale-up criterion (higher CO_2 and solution flow rates, respectively of $5 \text{ kg}_{\text{CO}_2}/\text{h}$ and $5 \text{ mL}_{\text{sol}}/\text{min}$). This behavior is probably associated to the limitations of the precipitator geometry (high flow rates in relation to vessel diameter and length), which do not favor the co-precipitation of the extract and the polymer, as previously discussed.

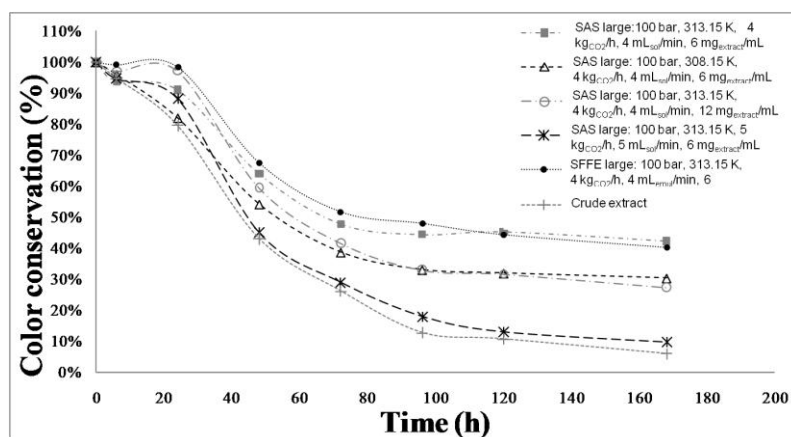


Figure 8.3 Color stability of encapsulated material in function of exposition time

8.4 Conclusions

The studied conditions allowed the production of encapsulated material from shrimp residue extract and a polymer. Also, microparticles were produced by SAS method and the best results in terms of particle characterization were obtained by shrimp residue extract in Pluronic F127 at the conditions of: temperature from 308.15 to 313.15 K , pressure from 100 to 120 bar , extract concentration of $6 \text{ mg}_{\text{extract}}/\text{mL}$ and ratio between feed solution and CO_2 of $1 \text{ (mL/min)/(kg/h)}$. The highest efficiency in astaxanthin encapsulation (74%) in a small scale unit (SAS procedure) was obtained at 100 bar , 308.15 K and ratio between solution and CO_2 flow rate of $1 \text{ (mL/min)/(kg/h)}$. Similar encapsulation efficiencies were achieved by the SAS large scale assays by means of the same operational conditions

used for the small scale unit. The best scale up criterion for SAS procedure, applied for shrimp residue extract and Pluronic F127, was to enhance the CO₂ and solution flow rates of 4 times between the small and the large scales. Additionally, nano-emulsion of shrimp residue extract were produced by using Hi-Cap 100 as surfactant, generating spherical capsules of pink shrimp extract by SFEE, constituted by extract particles (size: 0.7 μ m) encapsulated in starch particles (size: from 0.8 to 7 μ m), with the highest efficiency on astaxanthin encapsulation (93 %). The promising results obtained by SFEE suggest the importance of further investigation to optimize the encapsulation of shrimp residue extract in different polymers, with high particle performance. Finally, the products obtained by SAS and SFEE show higher color conservation compared to the crude extract, with an initial period of 24 h without color loss, evidencing the efficiency of the high pressure encapsulation processes studied.

8.5 References

- BASF. Pluronic® F127 Block Copolymer Surfactant. Available in: <http://www.basf.com>. Technical Bouletin, 2004.
- BURTON, G. W. Antioxidant action of carotenoid. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 109-111, 1989.
- COCERO, M. J.; FERRERO, S. Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch. Effect of operating conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 22, p. 237-245, 2002.
- COCERO, M. J.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; SALIMA, V. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 3, p. 546-555, 2009.
- FRANCESCHI, E.; KUNITA, M. H.; TRES, M. V.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, V. Phase behavior and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, n. 1, p. 8-20, 2008.
- GOUVEIA L.; NOVRE, B. P.; MARCELO, F. M.; MREJEN, D.; CARDOSO, M. T.; PALAVRA, A. F.; MENDES, R. L. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. **Food Chemistry**, v. 101, p. 717-723, 2007.
- GRANADO, F.; OLMEDILLA, B.; BLANCO, I. Review article: nutritional and clinical relevance of lutein in human health. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 90, p. 487-502, 2003.
- GRADINARU, G.; BILIADERIS, C. G.; KALLITHRAKA, S.; KEFALAS, P.; GARCIA-VIGUERA, C. Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. **Food Chemistry**, v. 83, p. 423-436, 2003.

- IMSANGUAN, P.; PONGAMPHAI, S.; DOUGLAS, S.; TEPPAITOON, W.; DOUGLAS, P. L. Supercritical antisolvent precipitation of andrographolide from *Andrographis paniculata* extracts: Effect of pressure, temperature and CO₂ flow rate. **Powder Technology**, v. 200, p. 246-253, 2010.
- KHATTAK, S. F.; BHATIA, S. R.; ROBERTS, S. C. Pluronic F127 as a cell encapsulation material: utilization of membrane-stabilizing agents. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 5-6., p. 974-983, 2005.
- LA FUENTE, J. C.; OYARZÚN, B.; QUEZADA, N.; VALLE, J. M. Solubility of carotenoid pigments (lycopene and astaxanthin) in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v. 247, p. 90-95, 2006.
- LIAU, B.-C.; SHEN, C.-T.; LIANG, F.-P.; HONG, S.-E.; HSU, S.-L.; JONG, T.-T.; CHANG, C.-M. J. Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 169-175, 2010.
- MARTÍN, Á.; VARONA, S.; NAVARRETE, A.; COCERO, M. J. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils, **Open Chemical Engineering Journal**, v. 4, p. 31, 2010.
- MATTEA, F.; MARTÍN, A.; MATÍAS-GAGO, A.; COCERO, M. J. Supercritical antisolvent precipitation from na emulsion: β -carotene nanoparticle formation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 238-245, 2009.
- McCLAIN, R. M.; BAUSCH, J. Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 274-285, 2003.
- MEZZOMO, N.; MAESTRI, B.; DOS SANTOS, R. L.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S. R. S. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue: influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1383-1391, 2011 - **chapter 5 of this thesis**.
- MIGUEL, F.; MARTÍN, Á.; GAMSE, T.; COCERO, M. J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene. Effect of the operating parameters. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 225-235, 2006.
- MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; MATTEA, F.; COCERO, M.J. Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 9-10, p. 1594-1602, 2008.
- NATIONAL STARCH FOOD INNOVATION. Technical Service Bulletin of Hi-Cap™ 100. National Starch and Chemical Company, 2011.
- SHEKUNOV, B. Y.; CHATTOPADHYAY, P.; SEITZINGER, J.; HUFF, R. Nanoparticles of poorly water-soluble drugs prepared by supercritical fluid extraction of emulsions. **Pharmacology Research**, v. 23, p. 196-204, 2006.
- STRAPPE, P. M.; HAMPTON, D. W.; CACHON-GONZALEZ, B.; FAWCETT, J. W.; LEVER, A.. Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 126-133, 2005.
- VARONA, S.; KARETH, S.; MARTÍN, Á.; COCERO, M. J. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 369-377, 2010.

CAPÍTULO 9: CONCLUSÕES

O aproveitamento do resíduo do processamento de camarão rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) na obtenção de extratos ricos em carotenóides pelas técnicas de extração e condições de processo avaliadas se mostrou adequada e tecnologicamente viável, de acordo com a maior ou menor pureza em astaxantina.

O estudo das técnicas de pré-tratamento da matéria prima revelou que o tratamento térmico é o processo mais efetivo na liberação dos carotenóides para a extração. A combinação de tratamento térmico, secagem e moagem se mostrou como o melhor procedimento avaliado para o preparo da matéria-prima, resíduo de processamento de *P. brasiliensis* e *P. paulensis*, a fim de recuperar a fração carotenóide.

A partir do estudo de técnicas convencionais de extração, conclui-se que os melhores solventes à extração de carotenóides do resíduo de processamento de *P. brasiliensis* e *P. paulensis* foram a acetona e a solução de hexano:isopropanol (50: 50, v/v), os quais promoveram os maiores conteúdos de carotenóides totais e extratos mais puros em astaxantina, principalmente quando fazendo uso da técnica de maceração das amostras. A extração com óleo pode ser uma boa alternativa à obtenção de extratos mais puros e protegidos contra a oxidação, apesar do baixo rendimento de extração, com os melhores resultados obtidos neste trabalho utilizando óleo de girassol a frio. Assim, o óleo de girassol e a mistura hexano:isopropanol (50:50) se mostraram como solventes mais adequados para o estudo da aplicação de co-solventes ao dióxido de carbono na extração supercrítica. Os espectros no UV-Visível e no infravermelho médio dos extratos de resíduo de processamento de camarão rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) obtidos por técnicas convencionais indicou que, além de carotenóides, há a presença de compostos com grupo fenol, proteínas e ácidos graxos, sendo a presença destes compostos possivelmente relacionada à dieta dos animais, a partir dos quais o resíduo foi gerado.

O estudo da cinética de ESC do resíduo de processamento de *P. brasiliensis* e *P. paulensis* indicou que o processo foi otimizado ao aumentar-se a vazão de CO₂ e diminuir-se o conteúdo de umidade na matéria-prima, chegando-se a um tempo ideal de 180 min para obtenção do rendimento global de extração. Dentre os modelos matemáticos aplicados, o que melhor se ajustou aos dados experimentais foi o de

Sovová (1994), o qual indicou que a convecção é mais significativa que a difusão no processo de ESC do resíduo de camarão rosa. Os valores de K_{ya} obtidos por esse modelo permitiram um bom ajuste de correlações de Sherwood apresentadas pela literatura, e estas indicaram que a convecção forçada é mais representativa que a natural no processo avaliado.

Os extratos do resíduo de camarão rosa obtidos por ESC apresentaram alto conteúdo de astaxantina, possível presença de flavonóides e outros carotenóides como a β -criptoxantina. O rendimento de ESC e a concentração de carotenóides foram otimizados com o aumento da massa específica do CO_2 , enquanto que a seletividade em astaxantina diminuiu com esse parâmetro. O maior rendimento de astaxantina foi obtido na condição de 300 bar/333,15 K usando CO_2 puro, superior a todos os sistemas a baixa pressão. O uso da mistura de hexano:isopropanol como co-solvente ao CO_2 supercrítico foi eficaz para aumentar o rendimento de extração mas não para a concentração de carotenóides no extrato. O uso de óleo de girassol como co-solvente ao CO_2 supercrítico promoveu os menores conteúdos totais de carotenóides no produto final quando comparado as demais condições de ESC. Em contrapartida, o produto final foi concentrado em carotenóides do resíduo de camarão rosa, sugerindo o uso deste em alimentos.

O processo de extração supercrítica apresenta aspectos interessantes relacionados às propriedades do solvente e custos específicos quando aplicado a extração de carotenóides do resíduo de camarão rosa, mesmo o custo inicial do equipamento sendo alto. Os resultados da determinação de custos mostraram que a ESC do resíduo de camarão na etapa CER usando um equipamento composto por 2 colunas de 400 L apresentou o menor custo específico. Assim, a ESC pode ser considerada uma tecnologia interessante e produtiva no aproveitamento de um resíduo industrial, não somente pelas suas conhecidas vantagens, mas também pela alta qualidade dos extratos, alto rendimento e baixo custo do produto final.

O estudo da capacidade antioxidante dos extratos de resíduo de camarão rosa obtidos pelas técnicas de extração em estudo revelou que, embora os resultados não indiquem que o extrato apresenta considerável poder antioxidante representado pelos altos EC_{50} , maiores atividades antioxidantes são observadas com o uso de alcoóis e acetona como solventes, nas extrações a baixa pressão, e maiores pressões na extração supercrítica.

O grupo de ácidos graxos insaturados se mostrou predominante nos extratos do resíduo de camarão rosa ($55 \pm 5\%$ para a amostra obtida por Soxhlet-etanol e $58 \pm 5\%$ para o extrato ESC a 333,15 K/300 bar), e o ácido graxo mais representativo foi o ácido oléico. Ainda, os extratos do resíduo de camarão rosa apresentaram alto conteúdo dos ácidos graxos ecosapentanóico e docosapentanóico, do grupo ômega-3, os quais apresentam diversos efeitos comprovados no benefício da saúde humana. Além disso, os mesmos extratos mencionados apresentam compostos fenólicos, em predominância na amostra obtida por Soxhlet.

O extrato ESC obtido a 333,15 K/300 bar, administrado na concentração de 50 mg/kg.d, apresentou os melhores efeitos na redução de peso dos camundongos (de 79 a 84 % durante todo o tratamento). Ambos os extratos Soxhlet-etanol e ESC (333,15 K/300 bar) apresentaram teores inferiores de colesterol e triglicerídeos que o grupo controle positivo (sem administração de extrato e tratado com ração hipercalórica), demonstrando o efeito hipolipemiante misto dos extratos de resíduo de camarão rosa. Os melhores resultados na redução dos níveis de triglicerídeos foram obtidos pelos extratos Soxhlet e ESC na concentração de 50 mg/kg.d, enquanto ambas as concentrações (50 e 200 mg/kg.d) do extrato Soxhlet foram as mais eficientes na redução do teor de colesterol. Assim, os extratos do resíduo de camarão rosa apresentaram vantagens perante fármacos hipolipemiantes consolidadas devido a se tratar de um composto natural que combina efeitos significativos no tratamento de obesidade e dislipidemias concomitante ao uso de dieta hipercalórica, sendo esse efeito provavelmente causado pela ação sinérgica da astaxantina, ácido docosapentanóico, ácido ecosapentanóico e flavonóides.

As condições operacionais estudadas para o processo de SAS e SFEE permitiram a produção de partículas de extrato do resíduo de camarão encapsulado. Micropartículas foram produzidas pelo método de SAS e os melhores resultados em termos de qualidade da partícula (morfologia e tamanho) foram obtidas nas condições de temperatura de 308,15-313,15 K, pressão de 100-120 bar, concentração de extrato de 6 mg/mL e razão entre as vazões de solução e CO₂ de 1 (mL/min)/(kg/h). A maior eficiência de encapsulamento de astaxantina (74 %) na unidade em escala pequena foi obtida a 100 bar, 308.15 K e razão entre as vazões de solução e CO₂ de 1 (mL/min)/(kg/h). Eficiências de encapsulamento similares foram obtidas através do método de SAS em escala grande nas mesmas condições operacionais usadas em escala pequena. O melhor critério de ampliação de escala para o procedimento

de SAS, aplicado ao extrato de resíduo de camarão e Pluronic F127, foi ao aumentar em 4 vezes as vazões de solução e CO₂ entre as escalas pequena e grande. Nano-emulsões de extrato do resíduo de camarão foram produzidas usando Hi-Cap 100 como surfactante, gerando cápsulas esféricas de extrato de camarão pelo método de SFEE e com a maior eficiência de encapsulamento de astaxantina (93 %). Por fim, todas as partículas de extrato de camarão encapsuladas por SAS e SFEE apresentaram melhor conservação de cor que o extrato puro não processado.

9.1 Sugestões para trabalhos futuros

- a) Usar sistemas com enzimas, ácidos e/ou auto-clavagem como pré-tratamento da matéria-prima;
- b) Otimizar a extração a baixa pressão com óleo vegetal, utilizando esses resultados para a aplicação do óleo como co-solvente de ESC;
- c) Otimizar a extração ultrassônica, avaliando diferentes tempos, razões entre matéria-prima e solvente, temperatura, etc.;
- d) Avaliar a atividade anti-tumoral dos extratos;
- e) Estudar a ESC com propano e/ou associada ao ultrassom para otimizar a extração de carotenóides;
- f) Estudar o processo de SFEE variando solvente orgânico, pressão, temperatura, vazões de solvente e solução;
- g) Estudar estabilidade biológica das cápsulas produzidas por SAS e SFEE.

ANEXO I – Projeto e construção do equipamento a alta pressão

Fluxograma da unidade de extração

A unidade de extração foi configurada de acordo com o princípio de funcionamento do equipamento apresentado por Zetzl et al. (2003), com algumas adaptações. A Figura I apresenta um esquema da configuração dos constituintes que compõem o equipamento construído neste trabalho.

Como apresentado na Figura I, o equipamento é basicamente constituído por:

- a) Cilindro de CO₂ equipado com tubo pescador;
- b) Tubulação de aço inox resistente as pressões máximas desejadas e nos diâmetros estabelecidos (1/4” e 1/8”);
- c) Anilhas, roscas, tees, conexões de aço inox resistentes as pressões máximas;
- d) Regulador de pressão do cilindro para o intervalo desejado (0-70 bar);
- e) Manômetro para acompanhamento da pressão na entrada do sistema;
- f) Banho termostatzado abastecido de etileno glicol para a refrigeração do CO₂;
- g) Bomba de alta pressão (até 1300 bar) para operar com CO₂ líquido;
- h) Válvula *back pressure* para a regulagem e manutenção da pressão de operação;
- i) Válvula agulha de ajuste macrométrico, localizada antes da entrada da coluna;
- j) Manômetro para acompanhamento da pressão na entrada da coluna;
- k) Coluna de extração em aço inox capaz de resistir até as máximas pressões desejadas, e encamisadas em aço galvanizado para a circulação de água aquecida;
- l) Banho termostatzado abastecido de água destilada;
- m) Manômetro para acompanhamento da pressão na saída da coluna;
- n) Válvula agulha com ajuste macrométrico para fornecer a expansão do CO₂ e, conseqüentemente a separação do CO₂ gasoso e extrato;
- o) Válvula agulha com ajuste micrométrico para realizar o ajuste da vazão de CO₂;

- p) Fitas de aquecimento cobertas por malha de fibra de vidro para aquecimento das válvulas *back pressure*, agulha macrométrica e agulha micrométrica, evitando o congelamento das mesmas e da tubulação que as conecta devido ao efeito Joule-Thompson provocado pela expansão de CO_2 no sistema;
- q) Reguladores de temperatura das fitas de aquecimento;
- r) Frasco coletor, feito de vidro na coloração âmbar;
- s) Rotâmetro para a medição da vazão de CO_2 que deixa o sistema.

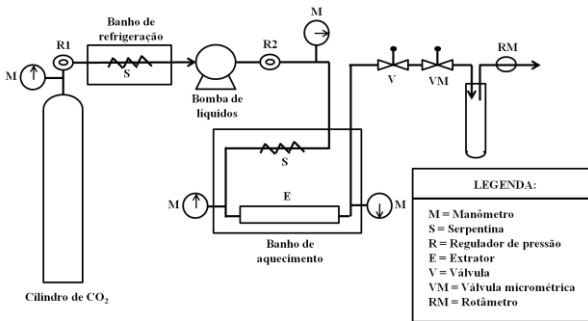


Figura I Esquema de constituintes do equipamento de alta pressão

O funcionamento da unidade de ESC é iniciado pela alimentação de CO_2 ao sistema através de um cilindro de CO_2 equipado com vara pescadora, para garantir a captação do fluido no seu estado líquido, e o regulador de pressão do cilindro é ajustado até a pressão ideal de alimentação (60 bar). O fluido segue pelo equipamento, passando por uma serpentina arrefecida em um banho termostatizado abastecido de etileno glicol que mantém a temperatura inferior a 278,15 K, garantindo o estado líquido do CO_2 na entrada na bomba. A bomba é acionada pelo sistema pneumático com ar comprimido em pressão adequada (até 6 bar). As válvulas agulha de saída (macrométrica e micrométrica) são fechadas para a pressurização do sistema. Através do fechamento da válvula *back pressure* e no funcionamento da bomba, o sistema é regulado na pressão desejada. A extração é iniciada pela abertura das válvulas agulha de saída e a regulação da vazão de CO_2 é realizada, mantendo o sistema em operação contínua até o tempo de ESC pré-determinado para cada material.

Projeto da coluna de extração

A coluna de extração foi projetada para suportar até 600 bar. Os cálculos de parede do cilindro foram realizados de acordo com o código

A.S.M.E (*American Society of Mechanical Engineers*, CARLSON, 2000) para vasos de alta pressão. Os cálculos consideram a pressão de trabalho, atribuída a 600 bar, a tensão máxima admissível para o aço inox 316 L, o raio interno do tubo e a eficiência da junta. A partir desses dados, calculou-se a tensão circunferencial e a tensão longitudinal, considerando-se o maior valor de espessura e adicionando um fator de segurança de 300 %, de acordo com instruções técnicas de engenheiros mecânicos da área de projetos de vasos resistentes a alta pressão. Assim, as especificações de diâmetro interno, externo, espessura de parede e dados da camisa da coluna de extração do equipamento construído estão apresentados na Figura II.

Constituintes do equipamento

O Quadro I apresenta os constituintes adquiridos para a montagem do equipamento da alta pressão, bem como marca, fornecedores e máximas pressões de segurança, e projeto/recurso utilizado para a obtenção dos itens citados.

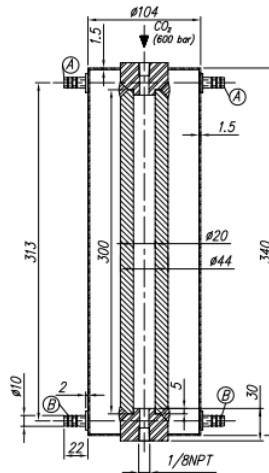


Figura II Projeto da coluna de extração

Construção e funcionamento do equipamento

Após a aquisição de todas as peças e utensílios, realizou-se a montagem de conexões de anilhas e válvulas, bem como instalação e fixação dos constituintes. Por fim, foram realizados diversos testes para identificação de vazamentos e verificação do perfeito funcionamento de

Quadro I Constituintes do equipamento de alta pressão e respectivas marcas, fornecedores e máximas pressões de segurança.

Item	Marca	Pressão máxima de segurança
Cilindro de CO ₂ equipado com tubo pescador	White Martins	100 bar
Tubulação em aço inox 316L nos diâmetros 1/4" e 1/8" (Fig. 4.3)	Swagelok	550 bar
Anilhas e rosca para as tubulações 1/4" e 1/8" (Fig. 4.3)	Swagelok	550 bar
Tees e conexões entre as tubulações 1/4" e 1/8"	Swagelok	550 bar
Bomba com conversão de pressão de 1:130 (Fig. 4.4)	Maximator	1300 bar
Conexões de entrada e saída da bomba (Fig. 4.5)	Swagelok	550 bar
Compressor para ar comprimido com caixa acústica	Schulz	20 bar
Manômetros para cilindro, entrada e saída da coluna (Fig. 4.6)	Conexões Gerais	1000 bar
Banho termostático com refrigeração e circulação (Fig. 4.7)	Microquímica	-
Unidade de tratamento de ar comprimido (Fig. 4.8)	ConecFit	20 bar
Válvula <i>back pressure</i> (Fig. 4.9)	Tescom	1000 bar
Válvula de segurança com pressão de alívio em 540 bar	HIP	1000 bar
Coluna de extração (Fig. 4.10)	-	600 bar
Válvula agulha de ajuste macrométrico (Fig. 4.11)	HIP	703 bar
Válvula agulha de ajuste micrométrico (Fig. 4.11)	HIP	703 bar
Fitas de aquecimento revestidas de fibra de vidro (Fig. 4.12)	Fisatom	-
Reguladores de temperatura	Fisatom	-
Rotâmetro para CO ₂	Swagelok	10 bar
Estrutura com perfil em alumínio e base em aço galvanizado	Famak	-
Chapa de válvulas em aço (Fig. 4.13)	-	-

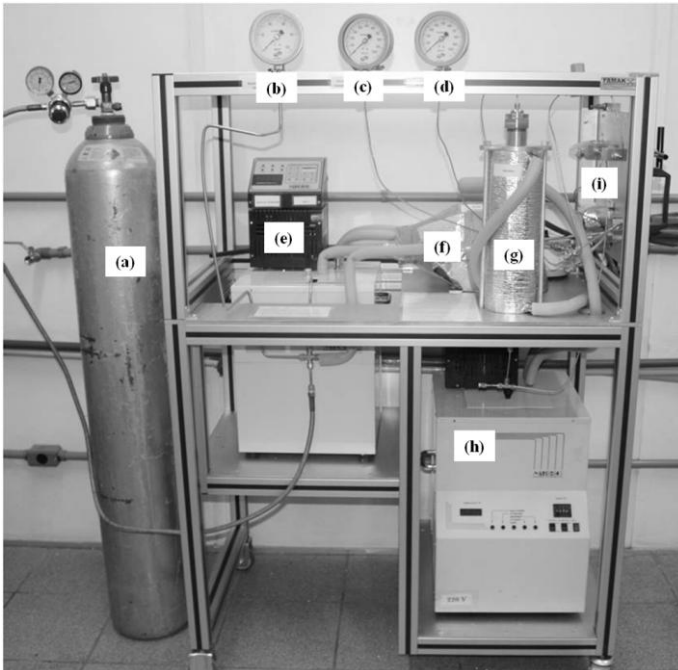
cada constituinte do equipamento, de acordo com o princípio de extração.

O processo de extração ocorre a partir do CO₂ solvente supercrítico que escoo através de um leito fixo constituído de partículas sólidas e localizado dentro da coluna de extração, solubilizando os componentes do sólido. O esgotamento do sólido ocorre na direção do escoamento, enquanto a massa de extrato na fase solvente aumenta na mesma direção. O solvente atravessa o leito fixo saindo carregado de soluto e, na saída do extrator, passa através de uma válvula de expansão, passando ao estado gasoso e, finalmente, o soluto é coletado (BRUNNER, 1994; REVERCHON e DE MARCO, 2006).

Como apresentado na Figura III, o equipamento de ESC apresenta o seguinte funcionamento: o cilindro de CO₂ com 99,9 % de pureza (White Martins) equipado com vara pescadora alimenta diretamente a linha de extração, sendo a pressão de entrada do gás é regulada através de um regulador de pressão; o CO₂ segue para um banho termostático (Microquímica, MQBMP01) com temperatura programada para 274,15 K através de uma serpentina de tubulação; a solução de etileno glicol proveniente do banho termostático também circula em uma mangueira a qual envolve a bomba (Maximator, M111) garantindo que o CO₂ se mantenha no estado líquido; a bomba trabalha alimentada por ar comprimido filtrado mantido na pressão de 5 bar e isento de umidade; a válvula *back pressure* do tipo globo (Tescom Cat n° 26-1761-24-161) é utilizada para regular e manter constante a pressão de operação; a coluna de extração constitui-se de um cilindro de aço inox encamisado de 34,0 cm de comprimento, 2,2 cm de raio com extremidades rosqueadas; a linha que liga a bomba a válvula *back pressure* bem como a linha após a coluna de extração que segue para as válvulas de expansão são mantidas sob aquecimento com fitas de aquecimento (Fisatom, 5 cm x 2,5 cm x 60 cm), de modo a evitar o congelamento das válvulas e tubulações; a temperatura da coluna de extração é mantida constante na temperatura de extração desejada através de um banho termostático (Microquímica, MQBTC99-20); o rotâmetro (ABB Automation Products 10 A 61) permite o controle do fluxo de solvente de 1,6 g/min a 41,6 g/min e o soluto é coletado em frascos âmbar conectados após as válvulas agulha macrométrica e micrométrica. A Figura XIV apresenta uma vista geral do equipamento de ESC construído neste trabalho.

Dificuldades encontradas

A tecnologia supercrítica ainda é praticamente inexistente nas indústrias brasileiras, apesar do crescente número de trabalhos acadêmicos estudando o comportamento desta técnica na extração de compostos bioativos. Assim, existe uma carência de pessoal capacitado nas empresas fornecedoras para orientar tecnicamente os detalhes da construção de um equipamento de alta pressão. Esta foi a principal dificuldade encontrada para a construção da unidade deste trabalho, especialmente com relação a informações sobre compatibilidade dos equipamentos disponíveis no mercado para adequação à unidade de extração proposta.



(a) Cilindro de CO₂; (b), (c) e (d) manômetros, respectivamente, do suprimento de CO₂, da entrada e da saída da coluna de extração; (e) e (h) banhos termostáticos de, respectivamente, resfriamento do CO₂ e aquecimento da coluna de extração; (f) bomba de CO₂; (g) coluna de extração; (i) chapa de válvulas.

Figura III Visão geral do equipamento de alta pressão construído

Referências

- BRUNNER, G. **Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation process**. v.4. Darmstadt: Steinkopff, 1994.
- CARLSON, L. H. C. **Projetos de Vasos de Alta Pressão – Código A.S.M.E (American Society of Mechanical Engineers)**. Laboratório de Controle de Processos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.
- DÍAZ-REINOSO, B.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Supercritical CO₂ Extration and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.54, n. 7, p. 2441-2469, 2006.
- MARTÍNEZ, J.; ROSA, P. T. V; MENUT, C.; LEYDET, A.; BRAT, P.; PALLET, D.; MEIRELES, M. A. A. Valorization of Brazilian Vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 6578-6584, 2004.
- MICHIELIN, E. M. Z.; BRESCIANI, L.F.V.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 33, p. 131–138, 2005.
- REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extration and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**. v. 38, p.146-166, 2006.
- ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical technology in Brazil: system investigated (1994–2003). **Journal of Supercritical Fluids**. v. 34, p. 109–117, 2005.
- ZETZL, C., BRUNNER, G., MEIRELES, M.A.A. Standardized low-cost batch SFE Units for University education and comparative research. In: **Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids**, vol. 1. Versailles, pp. 577–581, 2003.

ANEXO II - TRABALHOS PUBLICADOS/ENVIADOS

Artigos completos publicados em periódicos

1. MEZZOMO, Natália; MAESTRI, Bianca; MARASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra R. S. Influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**, v. 85, n. 3, p. 1383-1391, 2011.
2. MEZZOMO, Natália; DE PAZ, Esther; MARASCHIN, Marcelo; MARTÍN, Ángel; COCERO, Maria José; FERREIRA, Sandra R. S. Supercritical anti-solvent precipitation of carotenoid fraction from pink shrimp residue: effect of operational conditions on encapsulation efficiency. **The Journal of Supercritical Fluids**, 2011 (*in press*).
3. ANTUNES, Sara Albino; MEZZOMO, Natália; HENSE, Haiko; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Use of Carotenoid Extract from Natural Source in the Formulation of Fresh Pasta. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2012 (*in press*).

Artigos completos enviados para periódicos

1. MEZZOMO, Natália; MARTÍNEZ, Julian; MARASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra R. S. Supercritical fluid extraction of pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue: Process evaluation, extract composition and cost estimation. **The Journal of Supercritical Fluids**.
2. MEZZOMO, Natália; FARIAS, Mirelle Sifroni; MARASCHIN, Marcelo; FRIEDRICH, Maria Tereza; PEDROZA, Rozangela Curi; FERREIRA, Sandra R. S.. Effect of extraction systems on the biological activity of extracts from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing residue. **Lipids in Health and Disease**.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. MEZZOMO, Natália; MAESTRI, Bianca; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Supercritical fluid extraction from the processing residue of pink shrimp (*Penaeus brasiliensis*) to carotenoid concentration. In: **II PROSCIBA - Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids**, Natal, 2010.
2. MEZZOMO, Natália; MAESTRI, Bianca; MARASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Carotenoid recovery from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue by different techniques and solvents. In: **V Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras**, Campinas, 2010.
3. MEZZOMO, Natália; MARASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Efeito do solvente e técnica de obtenção na atividade antioxidante de extratos do resíduo de camarão rosa (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*). In: **V Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras**, Campinas, 2010.
4. MEZZOMO, Natália; MARASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Uv-Visible-IR Spectrometry profile of extracts from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue.. In: **V Simpósio Internacional Tendências e Inovações em Tecnologia de Óleos e Gorduras**, Campinas, 2010.

5. MEZZOMO, Natália; DOS SANTOS, Renata Lazzari; FARIAS, Mirelle Sifroni; VENTURA, Francielly; RASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra Regina Salvador. Extrato do resíduo de camarão rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) rico em astaxantina tem atividade hipolipemiante mista. In: **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Florianópolis, 2011.
6. MEZZOMO, Natália; MARASCHIN, Marcelo; FERREIRA, Sandra R. S.. Kinetics and mathematical modeling of supercritical fluid extraction from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing waste. In: **11th International Chemical and Biological Engineering Conference**. Lisboa, 2011.
7. MEZZOMO, Natália; DE PAZ, Esther, MARTÍN, Ángel; MARASCHIN, Marcelo; COCERO, Maria José; FERREIRA, Sandra R. S. Encapsulation of extract from pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) processing waste by supercritical technology. In: **11th International Chemical and Biological Engineering Conference**. Lisboa, 2011.
8. ANTUNES, Sara Albino; MEZZOMO, Natália; HENSE, Haiko; FERREIRA, Sandra R. S. Use of carotenoid extract from natural source in the formulation of fresh pasta. In: **9º Simpósio Latinoamericano de Ciência em Alimentos**. Campinas, 2011.
9. DOS SANTOS, Renata Lazzaris; MEZZOMO, Natália; FARIAS, Mirelle Sifroni; FERREIRA, Sandra Regina Salvador Ferreira. Obtenção de Extratos Naturais Bioativos a partir do Aproveitamento de Resíduos do Processamento de Camarão. In: **21º Seminário de Iniciação Científica da UFSC**. Florianópolis, 2011.