



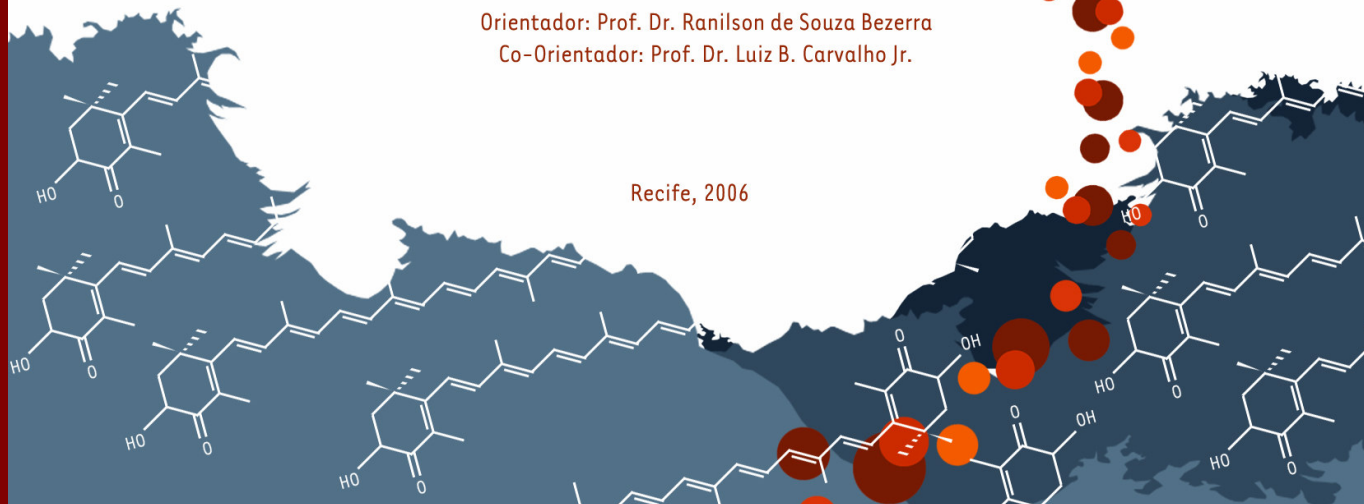
Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Mestrado em Bioquímica

Extração de Pigmentos Carotenóides de Resíduos
do Processamento do Camarão Branco
Litopenaeus vannamei Utilizando Autólise Proteolítica

Suzan Diniz Santos

Orientador: Prof. Dr. Ranielson de Souza Bezerra
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz B. Carvalho Jr.

Recife, 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**Extração de Pigmentos Carotenóides de Resíduos do Processamento do
Camarão Branco *Litopenaeus vannamei* Utilizando Autólise Proteolítica**

SUZAN DINIZ SANTOS

Recife, 2006

Extração de Pigmentos Carotenóides de Resíduos do Processamento
do Camarão Branco *Litopenaeus vannamei* Utilizando Autólise
Proteolítica

SUZAN DINIZ SANTOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos,
para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz B. Carvalho Jr.

Recife, 2006

Santos, Suzan Diniz

Extração de pigmentos carotenóides de resíduos do processamento do camarão branco *Litopenaeus vannamei* utilizando autólise proteolítica / Suzan Diniz Santos. – Recife : O Autor, 2006.

iv, 66 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Bioquímica – Enzimologia – Indústria camaroneira – Aproveitamento de bioprodutos. 2. Resíduos do processamento do *Litopenaeus vannamei* (camarão branco) – Extração de pigmentos carotenóides. 3. Gêneros textuais – Retextualização – Chat e arquivos de log. I. Título.

**577
572**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-265**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Orientador (presidente)

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Titular (interno)

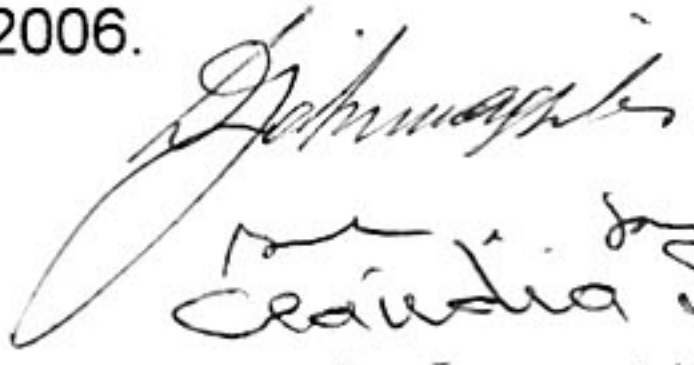
Prof^a. Dr^a. Claudia Sampaio de Andrade Lima
Titular (externo)

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva
Titular (interno)

Recife, 2006

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Suzan Diniz Santos**, realizada em 23 de fevereiro de 2006, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:00 horas, do dia 23 de fevereiro de 2006, foi aberto, na Sala de Aulas nº. 13 do CCB/UFPE, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Suzan Diniz Santos**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, fez a apresentação da aluna, de seu orientador ele próprio, do co-orientador Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Ele próprio, na qualidade de Presidente, José Luiz de Lima Filho, Nicácio Henrique da Silva, ambos do Depto. de Bioquímica/CCB/UFPE e Claudia Sampaio de Andrade Lima, do Depto. de Biofísica e Radiobiologia/CCB/UFPE. Após as apresentações, o Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Extracção de Pigmentos Carotenóides de Resíduos do Processamento do Camarão Branco *Litopenaeus vannamei* Utilizando Autólise Proteolítica"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 30 (trinta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 30 (trinta) minutos. Após a apresentação da mestranda, o Sr. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Dra. Claudia Sampaio de Andrade Lima que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Daí o Sr. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e deu algumas sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, o Sr. Presidente passou a palavra para o Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, o referido professor deu-se por satisfeito. Em seguida, o Sr. Presidente usou da palavra para tecer alguns comentários, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu no mesmo local, sem a presença do público. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 23 de fevereiro de 2006.


Claudia S. A. Lima
Nicácio Henrique da Silva

*Aos meus pais, que me viram em criança
dando os primeiros passos
e que, desde então, me acompanham em
toda as etapas importantes da minha vida.*

“Uma época está superada quando
seus temas e suas tarefas já não correspondem
as novas necessidades que vão surgindo”

(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

A deus por tudo.

Ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra pela constante demonstração de confiança, acolhida, amizade, sua simplicidade, suporte e orientação.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr. pela atenção, apoio, oportunidade, transferência de sua grande experiência e co-orientação.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima pela amizade, apoio e por ter me apresentado ao curso.

À Prof^a. Dr^a Claudia Sampaio pela simpatia, pelo tratamento sempre carinhoso, pelos seus ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Manfred Schwartz pelos ensinamentos, simpatia e apoio.

À Prof^a. Dr^a Danyelly Bruneska pela amizade, simpatia e primeiros ensinamentos no laboratório.

Ao Prof. Dr. Nicácio Silva pela atenção, apoio e por ter cedido no princípio do experimento a estrutura do seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Eduardo Beltrão pela atenção e contribuições ao paper.

À Prof^a. Dr^a Maria da Paz pela atenção, apoio e incentivos.

À Prof^a. Dr^a . Elizabete Chaves pela atenção, ensinamentos e por ter providenciado o HPLC para continuação das análises.

A EMPAF Ltd. (Netuno) em nome do Eng. de pesca André Ricardo Brito Santos por toda atenção, apoio e pelo fornecimento o resíduo.

A Ian pela amizade, apoio e contribuições.

À Me. Patrícia Castro pela atenção, apoio, correções e sugestões.

À Me. Kilma pelo apoio, amizade e ensinamentos do HPLC.

A Raimundo pelo apoio nas análises.

À Coordenação e professores do Mestrado de Bioquímica e aos seus funcionários em especial João Virgínio, José Miron de Oliveira, Neide Ferreira, Flavio e Dijalma.

A todos amigos do mestrado, por todos momentos que passamos juntos.

A todos que fazem parte do Laboratório de Enzimologia e Bioquímica (LIKA), pela amizade, carinho e troca de conhecimentos em especial a Thiago, Givanildo, Diego e Talita.

A Gildete por todo apoio e cuidados com Lara minha filha.

A meu marido e filha, por todo amor e por tornar a minha vida mais que especial.

Aos meus pais e irmãos por todo amor.

A meus sogros e cunhadas por todo carinho e apoio.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro, RECARCINE/FINEPE, SEAPE/CNPq e LIKA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Produção de Camarão.....	1
1.2. Resíduo do processamento de camarões como potencial fonte de carotenóides.....	3
1.3. Características químicas dos carotenóides.....	4
1.4. Diversas aplicações dos carotenóides.....	9
1.5. Carotenóides em crustáceos e carotenoproteínas.....	12
1.6. Extração de Carotenóides.....	14
1.7. Extração através de hidrolise enzimática.....	16
1.8. Requisitos e métodos para identificação de carotenóides.....	18
1.8.1. Precauções a serem tomadas no trabalho com carotenóides.....	18
1.8.2. Procedimentos analíticos gerais.....	19
1.8.3. Critérios mínimos para identificação.....	19
1.8.4. Separação por fases.....	20
1.8.5. Espectroscopia UV-visível.....	21
1.8.6. Cromatografia em coluna aberta (CC).....	22
1.8.7. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	23
1.8.8. Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE.....	24
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
3. OBJETIVOS.....	33
4. MANUSCRITO.....	34
5.CONCLUSÃO.....	61
6. ANEXO.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema demonstrativo da degradação de carotenóides.....	8
Figura 2	Ações biológicas atribuídas aos carotenóides.....	11
Figura 3	Propriedades físico-químicas dos carotenóides.....	11
Figura 4	Via de bioconversão dos carotenóides no camarão <i>Penaeus</i> , e via de conversão de retinóis.....	12
Figura 5	Estrutura da β -crustacianina, com duas moléculas de astaxantina ligadas à molécula protéica.....	13
Figura 6	Estrutura fina. Cálculo de %III/II para carotenóides.....	21
Figura 7	Fig. 1. Flow chart of the carotenoids extraction from <i>L. vannamei</i> processing waste adapted from Gildberg and Stenberg (2001).....	56
Figura 8	Fig. 2. TLC Comparison of the six fractions of silica column chromatography by ethyl acetate/hexane (2.5:1) system (1) and 0.44% ether in hexane system (2). Axt = astaxanthin standard; β = β -carotene; L = lycopene and F ₁ to F ₆ = fractions obtained from the silica column chromatography of the lipid extract of the DMSO phase.....	57
Figura 9	Fig. 3. HPLC carotenoid profile of the ethanol extract (a), the lipid extract in the hexane phase (b) and the lipid extract in the six fractions obtained from the silica column chromatography of the DMSO phase (c). Peak (I) with similar retention time of the standard astaxanthin and section (II) peaks of unidentified carotenoids that did not correspond to the carotenoids standards. For HPLC conditions, <i>column</i> : Water C18, 300 x 3.9 i.d. mm reverse-phase column (15-20 μ m - USA) at 23 °C. <i>Mobile phase</i> : isocratic (acetonitrile, methanol, chloroform and water; 60:25:10:5, v/v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min ¹ . Injection: 50 μ L. Detection: 480 nm.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Participação da Carcinicultura Brasileira por Região em 2004.....	2
	Nomes triviais e sistemáticos de determinados carotenóides de acordo com	
Tabela 2.	BRAMLEY e MACKENZIE <i>apud</i> ANDRADE (2003).....	7
	Table 1. Comparison between the shrimp head hydrolysis procedures by	
Tabela 3.	autolysis and Alcalase [®] : proteolytic activity and the amount of	59
	carotenoids extracted from <i>L. vannamei</i> head waste.....	
	Table 2. <i>L. vannamei</i> lipids extracted by ethanol and hexane/DMSO	
Tabala 4.	partitioned from 1 kg shrimp head.....	60
Tabala 5.	Table 3. Carotenoids content in ethanolic lipid extract from shrimp (<i>L.</i>	
	<i>vannamei</i>) processing waste.....	60

Os carotenóides consistem de uma das classes de pigmentos orgânicos mais abundantes na natureza. Eles estão presentes em organismos fotossintéticos, em fungos, bactérias, algas e em todas as classes de animais, desde os protozoários até os homens. Incluem um grupo de substâncias que possuem diferentes propriedades biológicas como fortalecer o sistema imunológico, reduzir o risco do desenvolvimento de doenças degenerativas, estimular comunicação celular. O trabalho propõe um processo de extração destes pigmentos de resíduos (cabeças) do camarão *Litopenaeus vannamei*, através de hidrólise proteolítica. Foi realizada autólise em vez da utilização da protease comercial, Alcalase[®]. Previamente, foi estabelecido que a atividade enzimática do extrato bruto de camarão utilizando azocaseína 1% (p/v) foi duas vezes maior que com Alcalase[®] 0,5% (p/v). As cabeças de camarão foram homogeneizadas em água destilada (1:1, p/v) e incubadas durante 2h a 40°C (autólise). Posteriormente, a temperatura foi elevada para 100°C durante 10 min e o homogeneizado centrifugado a 10.000 x g durante 10 min. Os carotenóides foram recuperados do precipitado através de extração com etanol 90% como demonstrado através de espectrofotômetro (470nm). Não houve diferença significativa no conteúdo de carotenóides extraídos através desse processo comparado com aquele em que foi utilizando Alcalase[®]. Astaxantina foi encontrada como sendo o carotenóide de maior ocorrência no extrato etanólico, sendo confirmado através dos métodos de TLC, HPLC e métodos espectroscópicos (UV-visível).

ABSTRACT

Carotenoids consist of the most abundant class of organic pigments in nature. They are present in the photosynthetic organisms, fungi, bacteria, algae and in all classes of animals from protozoa to human. They include an array of substances that present different biological properties such as enhancing immune functions; reduce the risk of developing degenerative diseases and stimulating gap junctions inter cellular communications. Shrimp waste is one of the most important natural sources of carotenoid. Here, it is proposed an alternative procedure to extract them by proteolytic hydrolysis from the waste (heads) of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Proteases of the animal themselves were used instead of commercially available protease Alcalase[®]. Previously, it was established that the enzymatic activity of the shrimp crude extract on azocasein was twice higher than that of the Alcalase[®]. The shrimp heads were minced with distilled water (1:1 w/v) and incubated at 40°C for 2h (autolysis). Then, the temperature was increased to 100°C for 10 min and centrifuged at 10.000 x g for 10 min. Carotenoids were recovered by 90% ethanol extraction from the precipitate as demonstrated by spectrophotometry (470nm). There was no difference in the amount of carotenoids extracted by this procedure compared with that employing Alcalase[®]. Astaxanthin was found to be the major carotenoid in the ethanol extract of *Litopenaeus vannamei* which was confirmed by chromatographic methods TLC, HPLC and spectroscopic methods using UV – visible analysis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção de Camarão

Os camarões marinhos formam um grande grupo composto de aproximadamente 2.500 espécies catalogadas até o momento. Contudo, somente cerca de 340 espécies até hoje conhecidas são importantes em nível comercial. Na família Penaeidae são encontradas as espécies mais relevantes para o cultivo em cativeiro, devido a sua capacidade de adaptação as diversas condições ambientais e de cultivo, excelentes taxas de crescimento, conversão alimentar e eficiência digestiva. Dentre as espécies mais relevantes estão os camarões *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis* e *Litopenaeus vannamei* (CARVALHO, 2004). No Brasil, predomina o cultivo semi-intensivo e intensivo do camarão branco *L. vannamei*, espécie exótica com capacidade de adaptação às mais variadas condições de cultivo, o que contribuiu para elevá-la à condição de principal espécie da carcinicultura brasileira (EMBRAPA, 2006).

Na primeira metade dos anos 90, as fazendas adotaram o cultivo do camarão *L. vannamei*, obtendo índices de produtividade e rentabilidade superiores aos das espécies nativas. As validações tecnológicas foram intensificadas no processo de adaptação do *L. vannamei* e a partir de 1995/1996, ficou demonstrada a viabilidade comercial de sua produção no país.

No nordeste do Brasil, o cultivo comercial do camarão (*Litopenaeus vannamei*) aumentou muito rápido nas últimas décadas. A produção, que em 1999 foi de 15.000t, aumentou para 90.190t em 2003 (MELO, 2005). Os anos de 2004 e 2005 foram marcados

por uma redução significativa da produção nacional, associada principalmente à ocorrência de doenças virais como a Mionecrose Infecciosa (ou INMV da sigla em inglês), a Mancha Branca (WSSV da sigla em inglês) e a Síndrome do Nanismo Deformativo (IHHNV da sigla em inglês), e a não-virais, como a Hepatopancreatite Necrosante (NHP da sigla em inglês) e a infestação por gregarina (NUNES, 2005). O censo de 2004 publicado pela Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC – aponta para uma produção de 75.904 toneladas, uma redução de 15,84% em relação ao ano de 2003 (RODRIGUES, 2005).

Segundo a ABCC (2006) o Nordeste, com seus 3.300 km de litoral, é responsável por 93% de todo o camarão produzido no Brasil (Tabela 1). Entre os maiores produtores estão o Rio Grande do Norte e o Ceará. Pernambuco é responsável por 6% de todo o camarão produzido no Brasil com uma produção de 4.531t.

Tabela 1. Participação da Carcinicultura Brasileira por Região em 2004.

Estado	PEQUENO			MÉDIO			GRANDE			TOTAL		
	Nº	Área	Produção	Nº	Área	Produção	Nº	Área	Produção	Nº	Área	Produção
RN	280	972	4.250	82	1.824	8.861	19	3.485	17.896	381	6.281	30.807
CE	119	604	3.502	58	1.439	7.493	14	1.761	8.410	191	3.804	19.405
PE	88	110	468	7	131	763	3	867	3.300	98	1.108	4.531
PB	59	170	739	7	164	850	2	296	1.374	68	630	2.963
BA	33	137	285	12	233	480	6	1.480	6.812	51	1.850	7.577
SC	48	276	958	45	953	2.909	2	132	400	95	1.361	6.267
SE	58	190	757	10	224	1.036	1	100	750	69	514	2.543
MA	4	17	76	3	63	304	0	0	0	7	85	226
ES	12	103	370	0	0	0	0	0	0	12	103	370
PA	3	11	32	2	27	210	0	0	0	5	38	242
PR	0	0	0	1	49	310	0	0	0	1	49	310
RS	0	0	0	1	8	20	0	0	0	1	8	20
AL	1	3	10	1	13	92	0	0	0	2	16	102
PI	7	42	114	4	86	202	5	623	2.225	16	751	2.541
TOTAL	712	2.635	11.561	233	5.214	5.214	52	8.744	41.167	997	16.598	75.904
Part. Rel. %	71,41	15,88	15,23	23,37	31,41	30,74	5,22	52,68	54,24	100,00	100,00	100,00

Fonte: ABCC (2006).

1.2. Resíduo do processamento de camarões como potencial fonte de carotenóides

A produção total de camarões marinhos no Brasil em 2003 foi de 117.247t, das quais 90.190t foram provenientes da aquicultura e 27.057t da pesca extrativa (FAO, 2006). Segundo MADRID (2005), do total cultivado, apenas 64,76% foi exportada para a Europa (37.965t de camarão inteiro) e Estados Unidos (20.443t de camarão descabeçado).

Durante o processamento, geralmente são removidas a cabeça, as cascas e a extremidade da cauda. Estes subprodutos correspondem a, aproximadamente, 50% do peso total do camarão, o que torna importante sua utilização, do ponto de vista econômico e industrial (ISLAMA *et al.*, 2004). Considerando esse percentual, somente a carcinicultura nacional gerou em 2003 cerca de 26.000 toneladas de cabeças e cascas.

No Brasil, a sobra do processamento de crustáceos é muitas vezes jogada às margens de rios e praias, acarretando um grande problema de poluição nestes locais (HOSANG, 2001). Claramente, as indústrias de processamento produzem uma carga pesada de resíduos que são compostos por uma mistura complexa de substâncias bioativas incluindo, músculos de camarão e peixe, carapaças e escamas, proteínas solúveis, gorduras e óleos, matéria orgânica parcialmente decomposta, diferentes substâncias químicas, nutrientes inorgânicos, particularmente nitrogênio e fósforo, entre muitos outros. A maioria destes resíduos gerados é despejada através de canais de descarga localizados próximo às águas costeiras, tornando-se um perigo potencial para o meio ambiente. Geralmente, a poluição excede a capacidade de assimilação das águas costeiras, gerando um sistema eutrófico (ISLAMA *et al.*, 2004).

Estudos têm sido realizados no sentido da caracterização dos produtos processados, assim como as diferentes formas possíveis da utilização de subprodutos do processamento

de peixes e camarão (CANO-LOPEZ *et al.*, 1987; SIMPSON *et al.*, 1998; GILGERG e STENBERG, 2001; CEJAS *et al.*, 2003; STEPNOWSKI *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005).

Nas últimas duas décadas, mais de 6000 componentes aromáticos voláteis compostos por aldeídos, cetonas, álcoois, componentes contendo N- e S-, furanos, etc., têm sido isolados de crustáceos e de uma série de outras espécies, sendo desenvolvidos para serem empregados como aromatizantes de alimentos. Esta tendência está relacionada à preferência dos consumidores por produtos naturais, em contrapartida aos compostos sintéticos que podem exibir em um grau maior alguma toxicidade ou causar algum dano à saúde (SIMPSON *et al.*, 1998).

O resíduo de camarão é umas das importantes fontes de carotenóides naturais podendo ser uma boa alternativa para carotenóides sintéticos, pois além da sua disponibilidade os carotenóides naturais possuem uma maior absorção relacionado aos sintéticos (SAHINDRA e MAENDRAKAR, 2004). Vários trabalhos têm sido realizados sobre a ocorrência e significância de carotenóides em camarões e lagostas (SACHINDRA *et al.* 2005). Considerando o valor potencial destes pigmentos, recentemente foi estudada a caracterização de carotenóides em *Streptocephalus dichotomu* e *Moina micuras* (VELU *et al.* 2003).

1.3. Características químicas dos carotenóides

Carotenóides representam uma família de componentes naturais lipossolúveis que também podem ser esterificados ou complexados com proteínas (SU *et al.*, 2002). Os carotenóides constituem o grupo de pigmentos orgânicos mais espalhados na natureza,

existindo nos organismos fotossintéticos, nos fungos, algas e bactérias, bem como em todos os grupos de animais, desde os protozoários até o homem (VILLELA, 1976).

Os carotenóides são unicamente sintetizados “de novo” pelos vegetais e protistas onde são acumulados ou oxidados. Animais superiores não são bioquimicamente capazes de sintetizar carotenóides, mas eles podem acumular e/ou converter precursores obtidos através das dietas (FONTANA *et al.* 2000). O β -caroteno é convertido em vitamina A, que não é sintetizada pelos animais, daí a enorme importância desse carotenóide para nutrição animal (VILLELA, 1976).

Mais de 600 variantes estruturais foram reportadas e caracterizadas em bactérias, algas, fungos e plantas superiores (FONTANA *et al.*, 2000). Segundo HONSANG (2001), a maioria destes pigmentos possui C_{40} , ou seja, são tetraterpenos, acíclicos ou alicíclicos, formados por oito unidades isoprenóides (C_5) unidos pela ligação cabeça-cauda, exceto na posição central, onde a ligação é do tipo cauda-cauda, produzindo uma estrutura simétrica com reversão do plano de simetria no centro da molécula.

Este esqueleto básico pode ser modificado de várias maneiras, através de hidrogenação, dehidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes ou combinação destes processos resultando em uma enorme diversidade de estruturas. A maioria possui uma estrutura central C_{18} , constituída por sete ligações duplas conjugadas. Os dois grupos ligados nas extremidades podem ser iguais, como em β -caroteno, ou diferentes, como na luteína (WEEDON, 1976).

Os carotenóides podem ser subdivididos em dois grupos principais: hidrocarbonetos, os quais são chamados de carotenos, e os oxicarotenóides, que contêm oxigênio além de carbono e hidrogênio, chamados de xantofilas. (DAVIES, 1976). Os

substituintes oxigenados mais comuns são os grupos hidroxílicos e epóxidos. São também encontrados grupos aldeídicos (CHO), cetônico (C=O), carboxi (CO₂H), carboximetoxi (CO₂Me) e metoxi (OMe) (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Já os epoxicarotenóides são produtos iniciais da degradação de carotenóides, facilmente formados durante extração, isolamento e outras etapas de análise. Os apocarotenóides são os carotenóides que apresentam cadeia mais curta. A exemplo dos epoxicarotenóides, os apocarotenóides são também considerados produtos iniciais da degradação dos carotenóides (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; ANDRADE, 2003).

As primeiras publicações envolvendo pigmentos de ocorrência natural conhecidos hoje como carotenóides surgiram no início do século XIX. Em 1987 o número de estruturas básicas de carotenóides determinados atingiram 450. Já em 1993 o número de estruturas básicas de carotenóides passou de 600, este avanço pode ser atribuído não somente pelo crescente interesse pelos carotenóides, mas principalmente aos progressos dos procedimentos cromatográficos e dos métodos espectroscópicos (EUGSTER, 1995). Carotenóides comuns possuem nomes triviais bem-estabelecidos, mas também existe a nomenclatura semi-sistemática recomendada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC da sigla em inglês), que descreve todas as estruturas pelo uso de sete diferentes grupos terminais (β , Y, ϵ , κ , Φ , χ e ψ). Os grupos terminais da cadeia poliênica completamente insaturada e totalmente *trans* são usados para formar os nomes raízes do caroteno C₄₀, por exemplo, β -caroteno, β,β -caroteno, Licopeno ψ,ψ -caroteno (Tabela 2) (ANDRADE, 2003).

Tabela 2. Nomes triviais e sistemáticos de determinados carotenóides de acordo com BRAMLEY e MACKENZIE *apud* ANDRADE (2003).

Nome Trivial	Nome sistemático
Anteraxantina	5,6-epoxi-5,6-dihidro- β,β -caroteno-3,3'-diol
Astaxantina	3,3'-dihidroxi- β,β -caroteno-4,4'-dione
Auroxantina	5,8,5',8'-diepoxi-5,8,5',8'-tetrahidro- β,β -caroteno-3,3'-diol
Cantaxantina	β,β -caroteno-4,4'-dione
β -Caroteno	β,β -caroteno
Licopeno	Ψ - Ψ -caroteno
Zeaxantina	β,β -caroteno-3,3'-diol

A cor dos carotenóides é proveniente de um cromóforo constituído de uma cadeia de duplas ligações conjugadas responsáveis pela sua habilidade em absorver luz na região visível. Pelo menos sete duplas ligações conjugadas são necessárias para que um carotenóide seja colorido, como no caso de ζ -caroteno, que é amarelo pálido. Fitoeno e fitoflueno, com três e cinco duplas ligações conjugadas, respectivamente, não possuem cor (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997; ANDRADE, 2003).

Quando o sistema conjugado é estendido, a cor também se intensifica; por exemplo, o licopeno, com 11 duplas ligações conjugadas, é vermelho. A ciclização coloca as duplas ligações, que se encontram dentro dos anéis, fora do plano da cadeia poliênica. Consequentemente, o γ -caroteno com uma dupla ligação conjugada localizada no anel é vermelho (ou laranja escuro), enquanto que o β -caroteno, com duas destas ligações em anéis é laranja, embora ambos tenham 11 duplas ligações conjugadas, como o licopeno (ANDRADE, 2003).

A cadeia poliênica, responsável pelas propriedades especiais e desejáveis dos carotenóides é também causa da sua instabilidade, ou seja, susceptibilidade à isomerização e oxidação (Figura 1).

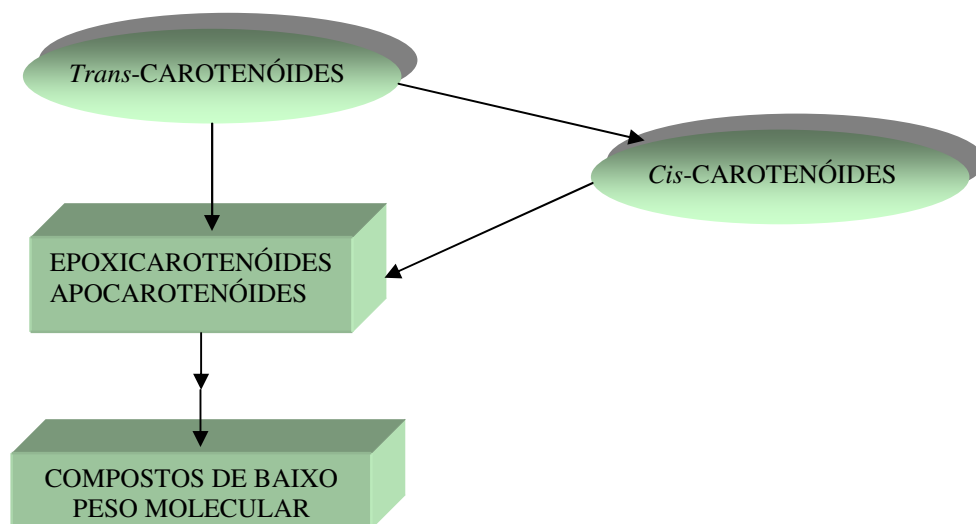


Figura 1. Esquema demonstrativo da degradação de carotenóides. (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

As condições que conduzem à isomerização e oxidação existem durante preparo doméstico, processamento industrial e, principalmente estocagem de alimentos. Calor, luz e ácidos promovem a isomerização de carotenóides *trans*, a sua configuração usual na natureza, para forma *cis*, com ligeira perda de cor e atividade biológica. A oxidação, principal causa da degradação de carotenóides, depende da disponibilidade de oxigênio, do tipo de carotenóide presente e do seu estado físico. Este evento também é estimulado por luz, calor, metais, enzimas e peróxidos e é inibido por antioxidantes.

Sendo lipofílicos, insolúveis em água, capazes de ligar-se com superfícies hidrofóbicas e solúveis de modo variável nos solventes orgânicos, os carotenóides são encontrados na natureza como soluções oleosas, dispersões coloidais ou complexados com

proteínas; assim ocorrem tanto em meios lipídicos como em meios aquosos. Os carotenóides são, portanto, comercializados como suspensões oleosas para alimentos à base de óleo, ou como emulsões ou preparações coloidais dispersáveis em alimentos a base de água. Nestas formulações, os carotenóides são fisicamente estabilizados, embora antioxidantes possam ser adicionados. As formulações comerciais de carotenóides são de dois tipos: extratos naturais e carotenóides sintéticos idênticos aos naturais (VILLELA, 1976; ANDRADE, 2003).

1.4. Diversas aplicações dos carotenóides

O mercado de carotenóides é amplo e promissor, levando em consideração apenas os utilizados como corantes alimentares e suplementos nutricionais representam uma média de 100 milhões toneladas por ano, com um faturamento global estimado em \$935 milhões em 2005 (FRASER e BRAMLEY, 2004). Recentemente o setor que tem mais contribuído para o desenvolvimento da indústria e alimentos é o setor de enzimas, cujo mercado mundial apresenta valor comercial superior a um bilhão e dólares anuais. Elas constituem o grupo mais importante de metabólitos microbianos e de diversificada utilização na indústria de alimentos, prevendo-se para 2006 um valor no mercado internacional da ordem de US\$ 214 milhões (LERAYER, 2006).

Durante os últimos anos, tem existido um interesse considerável em carotenóides dietéticos, principalmente pelo seu potencial em aliviar doenças relacionadas com a idade (FRASER e BRAMLEY, 2004). Outras atividades biológicas têm sido atribuídas mais recentemente aos carotenóides (Figura 2). Uma destacável é a sua função bem conhecida como precursor de vitamina A, fato que confere aos carotenóides o status de estar entre os

fitoquímicos mais bem citados como responsáveis pela redução do desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular, fortalecimento do sistema imunológico e proteção contra queimaduras solares (VELU *et al.* 2003, AZEVEDO–MELEIRO e RODRIGUEZ-AMAYA, 2004).

Esta hipótese é coerente com estudos examinando risco de doenças crônicas em relação a consumo de carotenóides dietéticos, os quais demonstraram que carotenóides possuem a capacidade de capturar não só apenas peróxidos de radicais lipídicos, mas também espécies de oxigênio singlete (SU *et al.*, 2002). Entretanto, é importante destacar que podem ocorrer efeitos adversos com altas doses de carotenóides, talvez por causa do seu efeito pró-oxidante. Isto foi observado em certos grupos de alto risco, particularmente em ex-fumantes (FRASER e BRAMLEY, 2004). A Figura 3 resume as propriedades físico-químicas dos carotenóides.

Os carotenóides possuem também grande importância para a aquicultura, fazendo parte de dietas como um suplemento no alimento de peixes salmonídeos (GILDBERG e STENBERG, 2001) e em cultivos de peixes ornamentais como um determinante da sua coloração. A pigmentação “natural” de salmões cultivados pode ser adquirida principalmente através da inclusão de astaxantina sintética ou de astaxantina extraída de crustáceos (GUILLOU *et al.*, 1995).

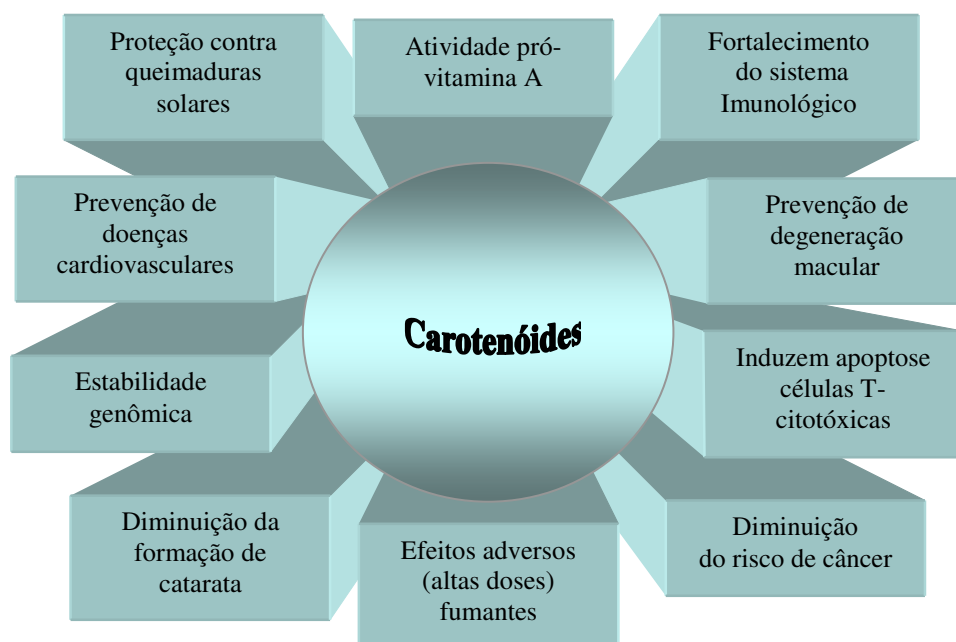


Figura 2. Ações biológicas atribuídas aos carotenóides. Adaptação da figura editada por RODRIGUEZ-AMAYA(1997).

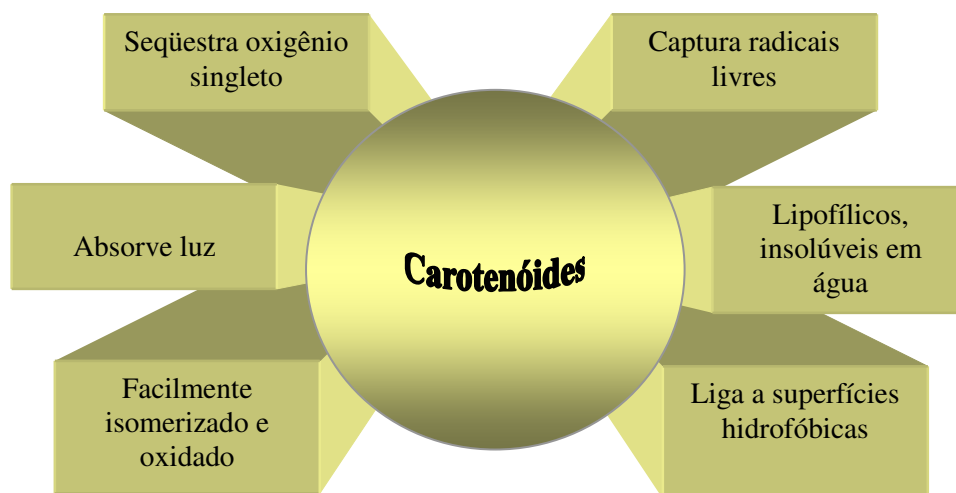


Figura 3. Propriedades físico-químicas dos carotenóides RODRIGUEZ-AMAYA (1997).

1.5. Carotenóides em crustáceos e carotenoproteínas

Em crustáceos os carotenóides estão presentes na forma de complexos protéicos (carotenoproteínas), principalmente na carapaça, apêndices torácicos, sangue, olhos, ovos, hepatopâncreas e ovário (KUO *et al.* 1976). Assume-se que os carotenóides em crustáceos apresentam várias funções relevantes no processo biológico como reprodução, incubação, crescimento e estabilidade de proteínas (NÈGRE-SADARGUES *et al.*, 2000). Astaxantina tem sido citada como principal carotenóide em alguns peixes como salmão e truta, bem como na maioria dos crustáceos como camarões, lagostas e caranguejos (Figura 4). Os intermediários na transformação de carotenóides dietéticos, como equinenona e cantaxantina são geralmente detectados em menor quantidade.

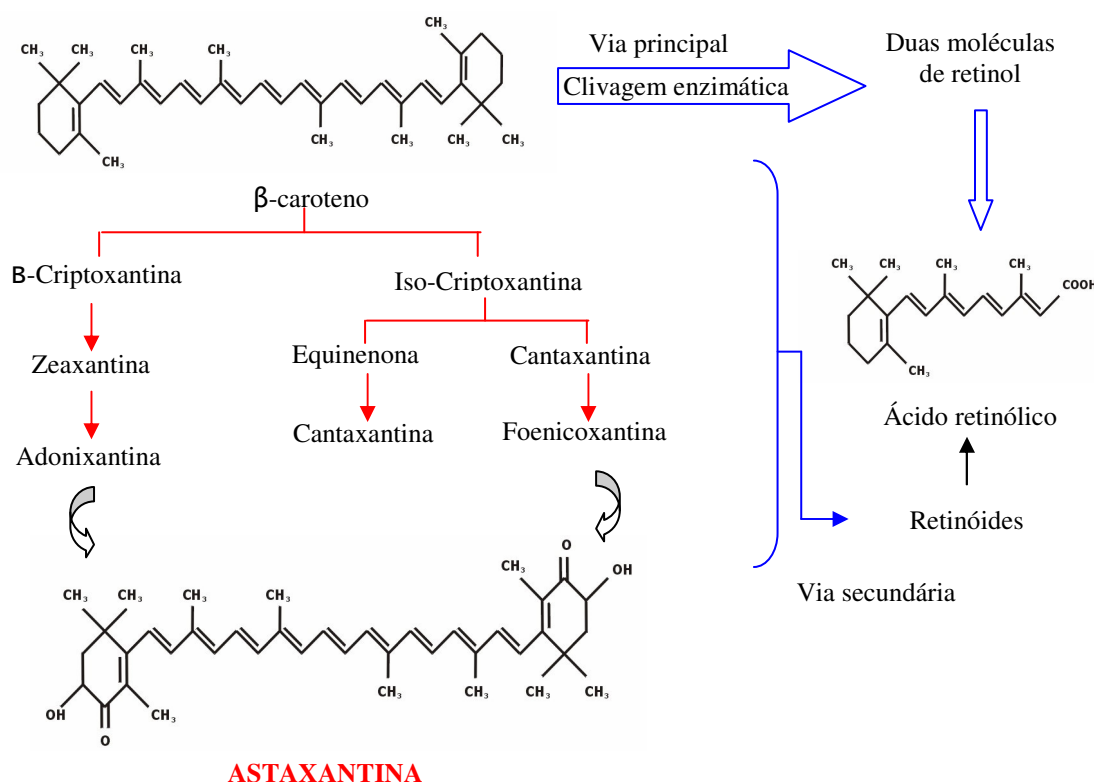


Figura 4. Via de bioconversão dos carotenóides no camarão *Penaeus*, e via de conversão de retinóis (NÈGRE-SADARGUES *et al.*, 2000).

O hepatopâncreas de espécies carnívoro-necrófagas como crustáceos é um órgão marcadamente pigmentado. A ocorrência de carotenóides na epiderme recobrindo os olhos está associada à estocagem de pigmentos de origem da dieta, indicando uma função fisiológica determinada (NÈGRE-SADARGUES *et al.*, 2000).

Crustacianinas são proteínas pigmentadas freqüentemente encontradas no exoesqueleto de várias espécies de crustáceos marinhos e a sua coloração é proveniente do carotenóide astaxantina (STAINISLAW e BRITTON, 2001) (Figura 5). A complexação deixa o carotenóide mais estável e estende a cor ao azul, verde ou púrpura. A cor cinza do camarão *L. vannamei* indica a presença deste composto. Com tratamento térmico, a desnaturação da proteína libera a astaxantina e sua cor vermelha se revela (ANDRADE, 2003). Carotenóides livres absorvem luz no comprimento de onda de 400-500nm e são responsáveis por várias colorações naturais amarelas, laranjas e vermelhas (WEESIE *et al.*, 1995).

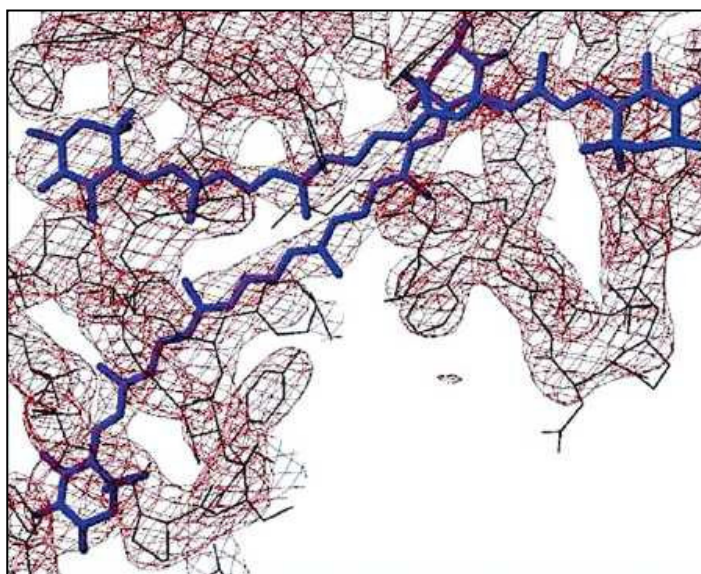


Figura 5. Estrutura da β -crustacianina, com duas moléculas de astaxantina ligadas à molécula protéica (ZAGALSKY, 2002).

A crustacianina é constituída por 16 subunidades de proteínas de ~20 kDa, cada um ligada a uma molécula de astaxantina. As subunidades são de dois tipos, conhecidas como A e C, as quais se combinam em pares com duas moléculas de astaxantina para formar β -crustacianina (λ_{max} . 580-590); oito destes são então associados em α -crustacianina native. De acordo com as informações cristalográficas e da determinação estrutural da subunidade A₁ (tipo C) já existente, foi possível confirmar a sua natureza lipocalina. O modelo foi utilizados em troca moleculares para esclarecer a estrutura da β -crustacianina cristalizada em óleo (ZAGALSKY, 2002).

1.6. Extração de Carotenóides

Para uma análise quantitativa de laboratório, é necessário utilizar materiais biológicos frescos, pois a oxidação e a decomposição enzimática de carotenóides deverão ocorrer logo após a coleta (SCHIERDT e LIAAEN-JENSEN, 1995). Caso contrário deverão ser armazenados abaixo de -10°C , até a sua utilização (DAVIES, 1976). Como os carotenóides ocorrem em uma variedade de organismos vivos, nenhum método de extração pode ser dito como completamente satisfatório como um padrão para satisfazer todas as necessidades (DAVIES, 1976). Sendo necessário um procedimento específico para cada variedade analisada.

Exceto no caso de alguns materiais secos, carotenóides são geralmente extraídos de amostras biológicas com solventes orgânicos que podem ser misturados com água, mais comumente acetona, metanol e etanol. A escolha do solvente depende do material biológico, do seu pré-tratamento, da composição de carotenóides, e se o objetivo é de

extração completa, parcial (SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN, 1995) ou para fins terapêuticos.

A extração eficiente dos carotenóides requer o rompimento mecânico dos tecidos do qual será extraído. Em escala de laboratório, o procedimento usual envolve homogeneização direta do tecido com um solvente em um agitador elétrico (para pequenas amostras, a moagem do tecido em acetona com areia lavada pode ser usada). Em escala comercial, o prolongamento do contato com o solvente sob agitação é um processo muitas vezes usado (BRITTON, 1995).

O solvente para extração deve ser utilizado frio, pois o aumento da temperatura pode danificar o pigmento. Após a filtração, os fragmentos sólidos são reextraídos duas ou três vezes com novo solvente até que toda a cor seja perdida. Para preparações comerciais em larga escala, o extrato é diretamente concentrado em solventes (HOSANG, 2001).

Após a extração, deve ser feita a remoção de água ou solvente de extração, indesejados para futuras análises qualitativas e quantitativas. Quando a amostra é menor que 2mL, contendo uma pequena quantidade de água, ela pode ser evaporada diretamente com nitrogênio gasoso ou, no caso de amostras maiores, evaporados com rota evaporador ou feita a separação de fases com solventes que não se misturem com água, como é o caso do hexano, éter ou uma mistura destes (SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN, 1995).

Quando utilizado o rota evaporador, deve se ter cuidado para que a temperatura da amostra não aumente muito. Após a evaporação da amostra é recomendado armazenar em uma atmosfera de nitrogênio ou argônio (BRITTON, 1995).

Saponificação (hidrólise alcalina) tem sido muito utilizada para facilitar a separação de carotenóides. A saponificação é vantajosa para a concentração de carotenóides, pois remove os lipídeos neutros e facilita a futura caracterização e quantificação dos

carotenóides livres. Os ésteres de ácidos graxos, que geralmente se encontram como misturas de ésteres com uma variedade de ácidos graxos são removidos (BRITTON, 1995).

A saponificação não é indicada no caso de animais marinhos, algumas plantas e algas que contêm astaxantina e outros 3-hidroxi-cetocarotenóides que podem ser oxidados na presença de base de oxigênio formando astaceno (BRITTON, 1995), o qual já não possui mais a mesma ação biológica.

O isolamento de carotenóides de resíduos de crustáceos pode ser feito através de extração com óleo vegetal (CHEN E MEYERS, 1982, HONSANG, 2001, SACHINDRA E MAHENDRAKAR, 2004). Porém, a astaxantina pode estar presente em muitos crustáceos formando complexo com proteína, o que dificulta a sua extração em óleo (HONSANG, 2001).

O uso de óleo vegetal, como óleo de soja, no processo de extração garante uma boa barreira ao oxigênio, retardando a oxidação, tornando assim o pigmento mais estável do que a extração com solvente. Na extração com solvente, a labilidade da astaxantina do extrato é obtida após a remoção do solvente, principalmente a degradação (HONSANG, 2001). Porém a extratividade do solvente é maior do que com óleo e a utilização de antioxidantes ou até o posterior armazenamento no próprio óleo vegetal diminui estes efeitos.

1.7. Extração através de hidrólise enzimática

Progressos na biotecnologia têm demonstrado a capacidade das enzimas de produzirem alimentos industrializados a partir de resíduos, valorizando assim seu manejo industrial. Neste contexto destacam-se as proteases que representam as enzimas industriais

mais empregadas no setor de alimentos. A aplicação de enzimas proteolíticas para extração de aromatizantes do pescado foi sugerida como uma forma de utilizar enzimas digestivas de resíduos do processamento de pescado para uma melhor utilidade econômica (SIMPSON *et al.*, 1997).

Tem sido demonstrado que proteínas do resíduo de crustáceos podem ser hidrolisadas através de proteases comerciais e recuperadas como hidrolisado protéico. Durante este processo, a ligação do complexo carotenoproteína é quebrada antes da extração (CHEN, 1982, GILDBERG, 2001) e os carotenóides são agregados a outros lipídeos.

As vantagens conferidas pela utilização de enzimas proteolíticas têm resultado no uso de várias proteases para produzir peptonas e hidrolisados protéicos, molho de peixe, remoção de tecidos de peixes e escamas e membranas de frutos do mar, e o isolamento de agentes aromáticos e pigmentos (SIMPSON *et al.*, 1998).

Tripsina e quimotripsina são as mais abundantes enzimas proteolíticas encontradas no hepatopâncreas de camarões, localizado na cabeça (MUHLIA-ALMAZÁN *et al.*, 2002) e são responsáveis cerca de 60% da digestão proteolítica total no hepatopâncreas de peneídeos (GALGANI *et al.*; GALGANI; TSAI *et al. apud* MUHLIA-ALMAZÁN *et al.*, 2002). Dessa forma, a hidrólise proteolítica utilizando as enzimas endógenas (autólise) representa uma alternativa para a redução de custos.

1.8. Requisitos e métodos para identificação de carotenóides

1.8.1. Precauções a serem tomadas no trabalho com carotenóides

O problema principal nas análises de carotenóides surge por causa da sua instabilidade. Desta forma, qualquer que seja o método escolhido, medidas de precaução para evitar a formação de intermediários indesejáveis e perdas quantitativas, devem ser levadas em consideração como práticas padrões no laboratório. Isto inclui a combinação da realização rápida das análises, exclusão de oxigênio, proteção contra luz, evitar temperaturas altas, evitar contato com ácidos, utilizar solventes de alto grau de pureza e armazenar sempre em nitrogênio ou argônio e em temperaturas baixas, de acordo com cada carotenóide (SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN 1995, BRITTON 1995, RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A combinação oxigênio, luz e temperatura são altamente destrutivas. A presença de traços de oxigênio em amostras estocadas mesmo sob baixas temperaturas, de peróxidos em solventes (ex. éter dietila e tetraidrofurano) ou de qualquer agente oxidante mesmo em extratos brutos de carotenóides podem rapidamente gerar um descoloramento e a formação de intermediários, tais como epóxicarotenóides e apocarotenóides (BRITTON, 1995, RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

A exposição de carotenóides à luz, especialmente luz solar e luz ultravioleta incidindo diretamente, induz a fotoisomerização *cis-trans* e a fotodestruição de carotenóides. Trabalhos com carotenóides devem ser realizados em ambientes com pouca luz. Os recipientes de armazenamento devem ser cobertos com papel laminado (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Por causa da termosensibilidade dos carotenóides, aquecimento deve ser realizado só quando absolutamente necessário como exemplo, na descomplexação de astaxantina da carotenoproteína em crustáceos. Extratos de carotenóides e soluções devem ser concentrados em um rota evaporador a pressão baixa, a uma temperatura inferior a 40°C e a evaporação do solvente deve ser terminada com nitrogênio ou argônio. (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

1.8.2. Procedimentos analíticos gerais

Segundo RODRIGUEZ-AMAYA (2001), a análise de carotenóides geralmente consiste de:

- Coleta e preparação da amostra,
- Extração,
- Partição com solventes antes da etapa de cromatografia,
- Saponificação e lavagem (depende da amostra),
- Concentração ou evaporação do solvente,
- Separação cromatográfica e
- Identificação e quantificação.

1.8.3. Critérios mínimos para identificação

Com a ocorrência de identificações inconcludentes ou errôneas na literatura, está sendo recomendado que os seguintes critérios mínimos sejam preenchidos para a

identificação (AZEVEDO-MELEIRO e RODRIGUES-AMAYA, (2004): $\lambda_{\max}$ e estrutura fina do espectro de absorbância visível (ou ultravioleta para cromóforos pequenos) devem estar de acordo em pelo menos dois solventes diferentes com o cromóforo sugerido; propriedades cromatográficas devem ser idênticas em duas técnicas, preferivelmente cromatografia de camada delgada (CCD) (R_f) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (t_R), e deverão ser realizadas co-cromatografia com padrões autênticos e espectro de massa, que permitam a confirmação pelo menos da massa molecular (BRITTON,1995). Porém, carotenóides comuns podem ser conclusivamente identificados através da junção e combinação da utilização de dados cromatográficos, análise na região UV-visível e reações químicas, o último para confirmação do tipo, localização e números de grupos funcionais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

1.8.4. Separação por fases

Os carotenos são solúveis em solventes de baixa polaridade, tal como, hexano e tolueno, e carotenóis (xantofilas) em solventes mais polares, incluindo etanol e piridina (SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN, 1995).

O método de separação de fases é vantajoso para separar carotenóides polares dos não polares antes da separação por cromatografia (SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN, 1995). Uma separação grosseira pode ser obtida através da partição do extrato bruto em dois solventes imiscíveis (1:1) (WEEDON, 1976). Todas as xantofilas contendo dois ou mais hidroxí ou ceto-grupos livres são extraídas na hipo-fase solvente mais polar (ex. metanol). Os carotenos, seus epóxidos, mono-ceto ou derivados monohidroxí ou xantofilas com seus

grupos hidroxí esterificados ou metilados permanecem na fase superior (ex. éter de petróleo) (DAVIES, 1976).

Partição entre hexano e dimetila de sulfóxido (DMSO) tem demonstrado ser ideal para remoção de lipídeos sem cor de tecidos de animais (SCHIEDT e LIAAEN-JENSEN, 1995).

1.8.5. Espectroscopia UV-visível

O comportamento do espectro de absorção ultravioleta e visível fornece o primeiro indício para informar a presença de carotenóides. A absorção do $\lambda_{\text{máx}}$ e a forma (estrutura fina) do espectro ambos fornecem o cromóforo. O espectro de absorção é amplamente apresentado em trabalhos publicados. Para dar uma idéia da estrutura fina espectral (%III/II) (Figura 6) que pode ser apresentada com o $\lambda_{\text{máx}}$ (BRITTON, 1995).

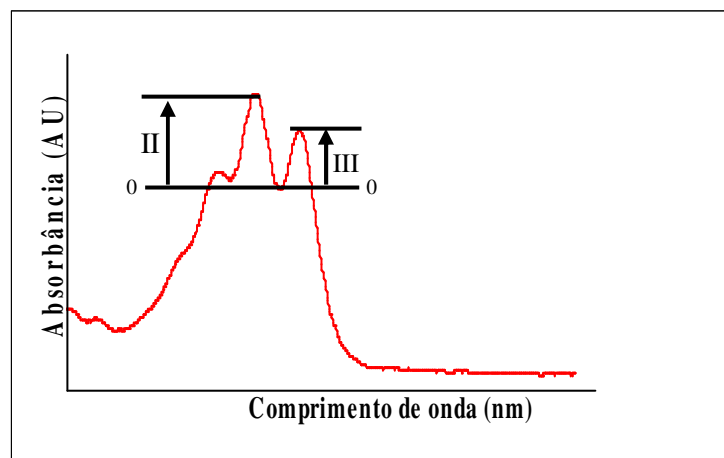


Figura 6. Estrutura fina. Cálculo de %III/II para carotenóides (BRITTON, 1995).

A estrutura do cromóforo, estrutura fina espectral (%III/II) é expressa como sendo o valor da altura da absorção do comprimento de onda mais longo, denominado III, e a absorbância do pico médio (geralmente $\lambda_{\text{máx}}$), denominado II, calculando-se a média dos dois picos como linha de base, multiplicado por 100. Para os cetocarotenóides conjugados como astaxantina, o qual fornece uma banda larga com nenhuma estrutura fina, não podendo ser calcular a média entre eles, então %III/II é igual à zero (BRITTON, 1995).

Espectroscopia UV-visível fornece informações sobre o cromóforo da molécula, mas não diz nada sobre grupos funcionais exceto a presença de grupos carbonílicos conjugados que fazem parte do cromóforo (BRITTON, 1995).

1.8.6. Cromatografia em coluna aberta (CC)

Historicamente, CC é o método cromatográfico mais antigo. Com introdução da cromatografia de papel, a CCD e principalmente a CLAE, CC foi gradativamente substituído por técnicas mais modernas para a análise qualitativa de carotenóides, mas permanece um método indispensável para separação e purificação de carotenóides em escala preparativa. Para quantidades de miligramas até 100g de carotenóides derivados de fontes naturais, a CC é ainda o mais importante método (BERNHARD, 1995).

A função principal de CC é separar misturas em frações de carotenóides suficientemente puros para subsequente cristalização ou podem ser depois separados mais eficientemente através de futuras cromatografias (BERNHARD, 1995).

Atualmente, a separação de carotenóides envolve cromatografia líquida-sólida (adsorção). Inúmeras fases sólidas têm sido aplicadas no estudo de carotenóides com e sem sucesso, como por exemplo, pó de alumínio, sílica, CaCO_3 , Ca(OH)_2 , MgO , ZnCO_3 ,

sucrose, ligação cruzada de dextrana (Sephadex), polietileno e misturas destes. Alumina e sílica, os quais são disponíveis comercialmente como produtos padrões, são atualmente os mais adotados. A separação nestes adsorventes é determinada através da polaridade, os carotenos hidrocarbonados são fracamente adsorvidos, enquanto que as xantofilas, contendo substituintes polares, principalmente grupos hidroxilas, são adsorvidos mais fortemente (BERNHARD, 1995).

1.8.7. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Mesmo tendo em mãos sofisticados equipamentos como CLAE, a CCD é ainda um método essencial e indispensável, fácil de executar e é mais adequado para uma identificação piloto de uma mistura de carotenóides desconhecidos a partir de padrões conhecidos. Os dados de retenção deste piloto poderão direcionar sobre a escolha das condições para subseqüentes cromatografias preparativas ou analíticas utilizando CLAE (SCHIEDT, 1995).

Identificações de compostos através da CCD são baseados inicialmente na comparação de valores de R_f (distância percorrida pela substância (cm, mm)/distância percorrida pela fase móvel (cm, mm) com aqueles de padrões comerciais. Os valores de R_f são, de modo geral, não exatamente reprodutíveis, então deverão ser considerados como um guia para relacionar distâncias e ordens de migração e deverão ser conferidos através de comparações cromatográficas com padrões, incluindo co-cromatografia (SCHIEDT, 1995).

A placa de sílica é até agora mais freqüentemente utilizada. Os melhores resultados são geralmente obtidos com a sílica gel 60G (contendo ligações CaSO_4) comercial. Alumina neutra ou básica é escolhida para carotenóides que são sensíveis a ácidos, ex. 5,6-

epóxidos. Poliamida e celulose deverão ser utilizadas para componentes muito polares ou hidrofóbicos. (SCHIEDT, 1995).

As análises químicas para identificação de carotenóides e seus grupos terminais, saponificação, acetilação, metilação, redução, oxidação, etc. podem, na maioria dos casos, ser monitorados através da CCD por causa das características de adsorção alteradas dos produtos das reações (SCHIEDT, 1995).

Para a CCD de fase-reversa, os valores de R_f geralmente se correlacionam bem com o tempo de retenção t_R do CLAE, enquanto que, quando utilizada cromatografia de fase-normal, as seqüências de carotenóides em CCD e CLAE vão ser diferentes (SCHIEDT, 1995).

1.8.8. Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE

Atualmente a CLAE tem sido um método de escolha para a identificação de carotenóides. Sendo um método muito eficiente de análise, realiza separações excelentes em período curto de tempo, é altamente sensível (nanogramas) e fornece um grande número de informações, também permitindo a recuperação da amostra (PFANDER E RIESEN, 1995, ANDRADE 2003).

Sílica e seus derivados são as fases estacionárias mais comuns em colunas para CLAE. As pequenas partículas de sílica podem apresentar formas esféricas ou irregulares e um tamanho definido de 3 a 10 μ m. O método de CLAE utiliza fase móvel isocrática ou por gradiente podendo a fase estacionária ser de fase-reversa ou fase-normal. (SU *et al.*, 2002). A coluna C₁₈ de fase-reversa é claramente a mais utilizada. A razão da popularidade desta coluna é principalmente devida, uma interação hidrofóbica fraca com a amostra, sendo

menos destrutiva que forças polares em CC de fase-normal, compatível com a maioria dos solventes e escala de polaridade de carotenóides e de alta disponibilidade comercial (RODRIGUES-AMAYA, 2001).

Existem controvérsias em relação à eficiência deste método em consequência da composição complexa e diversificada dos carotenóides. A primeira dificuldade para quantificação de carotenóides por CLAE é a existência de poucos padrões comerciais e a pureza incerta dos disponíveis. Outro problema verificado é a rápida degradação dos padrões após abertura da embalagem selada (ANDRADE 2003).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2006.
<<http://www.abccam.com.br/agronegocio/agro.htm>
- ANDRADE, V. S. Otimização da produção de carotenóides a partir de fungos filamentosos (Mucorales). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Ciências Biológicas. Recife. Universidade Federal de Pernambuco, 2003.
- AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Confirmation of identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. Food Compos. Anal. n. 17, p. 385-396, 2004.
- BERNHARD, K.. Chromatography: Part II column chromatography. In. BRITTON, G., PFANDER, H., LIAAEN-JENSEN, S. Vol: 1 A, Isolation and analysis. ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p. 117-130, 1995.
- BEZERRA, R.S.; ABADIE-GUEDES, R.; MELO F.R.M.. PAIVA, A.M.A.; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A.; GUEDES, R.C.A. Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression. Neurosci. Lett. In press, p. 1-5, 2005.
- BEZERRA, R.S.; LINS E.J.F.; ALENCAR, R.B.; PAIVA, M.G.; CHAVES M.E.C.; COELHO L.C.B.B.; CARVALHO L.B.JR.. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process. Biochem. n. 40, p. 1829-1834, 2005.
- BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In. BRITTON, G., PFANDER, H., LIAAEN-JENSEN, S. Volume 1 B: Spectroscopy. ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, p. 13-62, 1955.

CANO-LOPEZ, A.; SIMPSON B.K.; HAARD N.F.. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. J. Food. Sci. n. 52, p. 503-506, 1987.

CARVALHO, E. A. Frequência de arraçoamento sobre o desempenho zootécnico do camarão branco *litopenaeus vannamei* cultivado em cercados sob condições intensivas. Plano Dissertação (Mestrado Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar. Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2004.

CEJAS, J. R.; ALMANSA, E.; TAJERA N.; JEREZ, S.; BOLAÑOS, A.; LORENZO, A. Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins. Aquaculture n. 218, 457-469, 2003.

CHEN, H.-M.; MEYERS, S.P. Extraction of astaxanthin pigments from crawfish waste using a soy oil process. J. Food. Sci. n. 47, p. 892-896, 1982.

DAVIES, B.H. Analysis of carotenoid pigments. In: Goodwin, T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments. ed. Academic Press, London and New York. v. 18, p. 489-532, 1976.

EMBRAPA - Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2006.
<<http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/Aquicultura/index.htm>

EUGSTER, C. H. History: 175 years of carotenoid chemistry. In: BRITTON, G., PFANDER, H., LIAAEN-JENSEN, S. Vol: 1 A, Isolation and analysis. ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p. 1-12, 1995.

FAO - Food and agriculture organization of the united nations, 2006.
<http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector>.

LERAYER A. Biotecnologia na Indústria de Alimentos, apresentações. Conselho de informações sobre biotecnologia, 2006.

http://www.cib.org.br/busca.php?busca_menu=10

FONTANA, J. D.; MENDES, S. V.; PERSIKE, D. S.; PERACETTA, L. F.; PASSOS M. Carotenóides.cores atraentes e ação biológica. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. p. 40-45, 2000.

FRASER, P.D.; BRAMLEY P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Prog. Lipid. Res. n. 43, p. 228-265, 2004.

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

GUILLOU, A.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. Aquaculture. n. 130, p. 351-360, 1995.

HOSANG, K. Extração de pigmentos carotenóides a partir de resíduos do processamento de camarão (*Farfantepenaeus paulensis*). Dissertação (Mestrado em ciências dos alimentos) – Departamento de Ciências dos Alimentos do Centro de ciências Agrárias. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

ISLAMA, M. S.; KHANB, S.; TANAKA, M. Waste loading in shrimp and .sh processing e uents:potential source of hazards to the coastal and nearshore environments. Marine Pollution Bulletin n. 49, p. 103 –110, 2004.

KUO, H.-C.; LEE, T.-C.; CHICHESTER C.O.; SIMPSON, K. L. The carotenoids in the deep sea red crab, *Geryon quinquedens*. Comp. Biochem. Physiol. v. 54B, p. 387-390, 1976.

MADRID, R. M. Análise das exportações da carcinicultura brasileira de 1999 a 2003: cinco anos de sucesso e, 2004, o início de uma nova fase. Revista da ABCC, Recife, v. 7, n. 1, p. 76-84, 2005.

MELO, S. Carcinicultura: uma atividade em busca da sustentabilidade. Panorama da Aqüicultura, Rio de Janeiro, v. 15, n. 92, p.34-35, novembro/dezembro 2005.

MUHLIA-ALMAZÁN, A.; SÁNCHEZ-PAZ, J. A; YEPIZ-PLASCENCIA, G,; PEREGRINO-URIARTE A. B. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Phys. B. 133, p. 383-394, 2002.

NÈGRE-SADARGUES, G.; CASTILLO, R.; SEGONZAC, M. Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocatididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge. Comp. Biochem. Phys. A. n. 127, p. 293-300, 2000.

NUNES, A.J.P. Um ano de mudanças, perdas e ganhos. Panorama da Aqüicultura, Rio de Janeiro, v. 15, n. 92, p.26-33, novembro/dezembro, 2005.

PFANDER, H.; RIENSEN, R. Chromatography: Part IV High-performace Liquid Chromatography. In: BRITTON, G., PFANDER, H., LIAAEN-JENSEN, S. Vol: 1 A, Isolation and analysis. ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p. 243-252, 1995.

RODRIGUES-AMAYA, C.H. A Guide to Carotenoid Analysis. In Foods. ed. ILSI Press, Washington DC, 2001.

RODRIGUES-AMAYA, C.H. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin a carotenoids in prepared, processed, and stored foods. ed. John Snow, Inc/OMNI Project, p. 1-93, 1997.

RODRIGUES J. Carcinicultura marinha: Desenpenho 2004. Revista ABCC ano 7, n. 2, p. 38-44, Jun, 2005.

SACHINDRA, N. M.; BHASKAR, N.; MAHENDRAKAR, N.S. Crotenoids in crabs marine and fresh wters of iIndia. LTW n. 38, 221-225, 2005.

SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N.S. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetables oils. Bioresource. Technol. In press, p. 1-6, 2004.

SCHIEDT, K.; BISCHOF, S.; GLINZ, E. Isolation of astaxanthin and its metabolites from skin of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In. BRITTON, G., PFANDER, H., LIAAEN-JENSEN, S. Vol: 1 A, Isolation and analysis. ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p.243-252, 1995.

SCHIEDT, K.; LIAAEN-JENSEN, S. Isolation and analysis. In. BRITTON, G.; PFANDER, H.; LIAAEN-JENSEN, S. Vol: 1 A, Isolation and analysis. ed. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. p. 81-108, 1995.

SIMPSON, B.K.; NAYERI, G.; YAYLAYAN, V.; ASHIE, I.N.A. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chem. n. 61, p. 131-138, 1998.

STAINISLAW, K., BRITTON G. A study of protein-carotenoid interactions in the astaxanthin-protein crustacyanin by absorption and StarK spectroscopy; evidence for the precence of three spectrally distinct species. Biochim. Biophys. Acta. n. 1544, p. 301-310, 2001.

STEPNOWSKI, P., ÓLAFSSON, G., HELGASON, H., JASTORFF, B. Recovery of astaxanthin from seafood wastewater utilizing fish scales waste. *Chemosphere*. n. 54, p. 413-417, 2004.

SU, Q.; ROWLEY, K.G.; BALAZS, N.D.H Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *J. Chromatogr. B*. n. 781, p. 393-418, 2002.

VELU, C. S.; CZECHUGA, B.; MANUSWAMY, N. Carotenoprotein complexes in entomostracan crustaceans (*Streptocephalus dichotomus* and *Moina micrura*). *Comp. Biochem. Phys. B*. n. 135, p. 35-42, 2003.

VILLELA G.G. Carotenóides. In: *Pigmentos animais*. ed. Academia Brasileira de Ciências. p. 17-42, 1976.

WEEDON, B.C.L. Chemistry of carotenoids. In: GOODWIN, T.W. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. ed. Academic Press, London and New York. 3, p. 73-123, 1976.

WEESIE, R.J.; ASKIN, D.; JANSEN, F.J.H.M.; GROOT, H.J.M.; LUGTENBURG, J.; BRITTON, G. Protein-chromophore interactions in β -crustacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, *Homarus gammarus* a study by ^{13}C magic angle spinning NMR. *Federation of European Biochemical Societies*. n. 362, p. 34-38, 1995.

ZAGALSKY P. Colouration in marine invertebrates - A central role for astaxanthin complex. *The Synchrotron Radiation Source*. p. 8, 2001-2002.

3.OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Propor um processo para extração de carotenóides em resíduo do processamento (cabeças) do camarão (*Litopenaes vannamei*), utilizando a hidrólise proteolítica sem a adição de enzima exógena.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a atividade enzimática da própria enzima do resíduo de camarão (cabeça) com uma enzima comercial, Alcalase[®],
- Quantificar os carotenóides extraídos do resíduo de camarão (cabeça) das hidrólises proteolíticas, das duas enzimas,
- Purificar, identificar e quantificar carotenóides utilizando filtração por partição, CC, TLC, HPLC e espectrofotômetro.

TÍTULO

**Recovery of carotenoids pigments from shrimp processing
waste using proteolytic autolysis**

A SER SUBMETIDO À REVISTA

CHEMOSPHERE

Tipo de Material: *Periódicos com texto completo*

Indexado ISI: *sim* Fator de Impacto: **2.359** (2004)

Editor/distribuidor: ISSN: 0045-6535

Recovery of carotenoids pigments from shrimp processing waste using proteolytic autolysis

**Suzan D. Santos¹, Thiago B. Cahú¹, Maria da Paz C. Silva¹, Claudia S. A. Lima²,
Manfred Schwartz³, Luiz B. Carvalho Jr¹ and Ranilson S. Bezerra^{1*}**

1 – Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco.

2 – Laboratório de Biofísica Química, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco.

3 – Central Analítica, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco.

Corresponding author:

Ranilson S. Bezerra.

Laboratório de Enzimologia – LABENZ, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50670-910 Recife, PE, Brasil.

Tel.: 55-81-21268540; Fax: 55-81-21268576.

E-mail: ransoubel@lika.ufpe.br and ransoubel@uol.com.br.

Abstract

Shrimp processing waste can be economically an attractive natural source of carotenoids, important group of substances that address different biological properties. Here, it is proposed an alternative procedure to extract them from the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste (heads). Proteases of the animal themselves (autolysis) were used instead of commercially available protease Alcalase[®]. Previously, it was established that the enzymatic activity of the shrimp crude extract on azocasein was about twice higher than that of the 0.5% (w/v) Alcalase[®]. The shrimp heads were minced and incubated at 40°C for 2h and the temperature was increased to 100°C for 10 min and centrifuged at 10,000 xg for 10 min. Carotenoids were recovered by ethanol extraction from the precipitate and carapace, and there was not different in terms of amount compared to the procedure employing Alcalase[®]. Astaxanthin was found to be the major carotenoid in the ethanol extract of *Litopenaeus vannamei* confirmed by chromatographic methods TLC, HPLC and spectral fine structure by spectrophotometry.

Key words: carotenoids extraction process, astaxanthin, proteolytic autolysis, shrimp waste, *Litopenaeus vannamei*.

1. Introduction

In Northeast Brazil, the commercial shrimp (*Litopenaeus vannamei*) culture has increased very fast in the last decade. The shrimp production in 1999 reached 15,000 ton, whereas in 2004 has increased up to 90,190 ton. Furthermore, there is a perspective to get up to 17,000 hectares of cultivated area in 2005, with an estimated production of 105,000 ton (Melo, 2005). Therefore, the discard high amount of waste (about 35% of the total humid weight) has constituted a problem.

Recovering of active biomolecules from this material is of industrial interest, implicating in economic and ecological value to fishery industries. Shrimp processing waste is one of the most important natural sources of carotenoid (Sachindra et al., 2004). On the other hand, carotenoids represent a family of natural liposoluble compounds that can also be esterified or complexed with protein. During proteolytic digestion, carotenoids are released from associated proteins and aggregate with other lipids. More than 600 structural variants were reported and characterized, from bacteria, algae, fungi and superior plants (Su et al. 2002).

Animals are not able to biosynthesize carotenoids, thus their carotenoids are normally diet derived (Rodrigues-Amaya, 2001). In crustaceans they are present as a carotenoprotein in some associations in the carapace, legs parts, blood, eyes, eggs, hepatopancreas and ovary (Kuo et al., 1976), assuming various biological functions such as reproduction, hatching, growth and protein stabilization (Nègre-Sadargues et al., 2000). Astaxanthin is cited as the major carotenoid of crustaceans, such as shrimps, lobsters, crabs, as well as fishes, such as salmon and trout (Rodrigues-Amaya, 2001).

This molecule is of economical importance to the aquaculture, mainly due to pigmentation of farmed salmonids. The natural pigmentation of farmed fish can be achieved mainly by the inclusion in the diet of astaxanthin from crustacean sources (Guillou, et al., 1995; Gildberg and Stenberg, 2001). Moreover, the inclusion of this carotenoid in diets seems to improve the immunological system of farmed shrimps and fishes (Ytrestoyl, 2004).

Carotenoids have been among the most cited phytochemicals responsible for reducing the risk of developing degenerative diseases such as cancer, cardiovascular diseases, cataract and macular degeneration (Azevedo–Meleiro and Rodriguez-Amaya, 2005). This statement is mainly due to their antioxidative properties promoting a protection against reactive oxygen species produced in certain pathological states (Young and Lowe, 2001).

Previous studies with shrimp (*L. vannamei*) carotenoids showed the antagonizing action of shrimp carotenoids on the brain spreading depression-susceptibility changes promoted by ethanol in the rat developing cerebral cortex (Bezerra et al. 2005a). However, adverse effects may occur if high dosages of carotenoids are applied, maybe due to the pro-oxidant effect. In fact that was observed in high-risk groups as ex-smokers (Fraser and Bramley, 2004).

Carotenoids are also commercially used as food colorants and in nutritional supplements, representing an estimated yield of 100 million tones per year with a global value of around US\$935 million in 2005 (Fraser and Bramley, 2004).

The present paper describes a process for carotenoids extraction from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste (heads), based on the proteolytic autolysis. The quantification, partial identification and characterization of these carotenoids are also reported.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Heads of *L. vannamei* were provided by EMPAF Ltd. They were packed in plastic bags and stored at -20°C until use. Commercial protease used was Alcalase[®] (2.4 l FG) provided by Novozyme – Brazil S.A. All others reagents used were of analytical grade, provided by SIGMA Chemical Co. (USA) or Merck (Brazil).

2.2. Proteolytic activity

Four different batches of shrimp heads were homogenized in distilled water (1:1; w/v) by using a tissue homogenizer. The resulting preparations were centrifuged at 10,000 xg for 10 min at 10°C . The proteolytic activities of the obtained supernatants and 0.5% (w/v) Alcalase[®] were assayed (duplicate) using 1 % (w/v) azocasein (Alencar et al., 2003; Bezerra et al., 2005b). Briefly, the sample (30 μl) was incubated with 1 % (w/v) azocasein (50 μL ; Sigma, USA), prepared in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.2, for 60 min at 25°C . Exactly 240 μL of 10 % (w/v) trichloroacetic acid were then added to stop the reaction. After 15 min under resting, centrifugation was carried out for 5 min at 8,000 xg. The supernatant (70 μL) was added to 1 M NaOH (130 μL) in a 96-well microtiter plate and the absorbance of this mixture was measured in a microtiter plate reader (Bio-Rad 680) at 450 nm against a blank similarly prepared except that 0.9% (w/v) NaCl replaced the crude extract sample. Previously, it was established that during 60 min of reaction under above conditions first order kinetics was followed. Unit (U) of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme capable of hydrolyzing azocasein to produce 1.0 change in absorbance per minute.

The obtained supernatant, *Litopenaeus vannamei* proteases from now on abbreviated as LIVAP, was frozen at -20°C for further use in enzymatic assays.

2.3. Extraction and analysis of carotenoids

2.3.1. Extraction using LIVAP and 0.5% (w/v) Alcalase[®]

The carotenoids extraction from shrimp processing waste, based on Gildberg and Stenberg (2001), was as followed (Figure 1): In a reaction vessel (100 mL), shrimp waste (30g of heads) was minced and mixed with either 30mL of distilled water (autolysis) or 30 mL 0.5% (w/v) Alcalase[®]. The temperature was equilibrated to 40°C and proteolytic hydrolysis was allowed for 2 h. Afterwards the preparations were heated at 100°C for 10 min for proteases inactivation. They were filtered through gauze (porosity of 1 mm) to retain the carapace and the filtered solution was centrifuged 10 min at 10,000 xg. The carapace and the centrifugation precipitate were incubated with 30 mL 90% (v/v) ethanol each overnight. The ethanol solution was collected and additional ethanol incubation was successively carried out during 60 min, 30 min and 15 min until the ethanolic solution absorbance at 470 nm reached the value of 0.050. The ethanolic solutions obtained from the four incubations were collected together (about 200 mL), concentrated under vacuum at 37°C using a rotary flash evaporator and dried under N_2 atmosphere. From now on, all experiments were undertaken preventing from light conditions under N_2 conditions to avoid possible *cis/trans* isomerization and oxidation of the carotenoids and stored at -20°C until analyses.

The approximate amounts of carotenoid amounts in the ethanolic solutions were spectrophotometrically determined (Ultrospec 3000 *pro* spectrophotometer; Bio-Rad) according to the formula (Schiedt and Liaaen-Jensen, 1995):

$$\text{mg carotenoids} = \frac{A \times \text{vol} \times 1000}{A_{1\text{ cm}}^{1\%} \times 100}$$

Where A, vol and $A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ stand for the absorbance at 470 nm, volume in mL and the astaxanthin specific absorption coefficient in ethanol, respectively.

2.3.2. *Quantification and characterization of carotenoids*

2.3.2.1. *Phase separation*

The carotenoids extracted as above were partitioned in hexane/dimethyl sulphoxide (DMSO) according to Schiedt et al. (1995). The ethanol extracted carotenoids and the hexane phase sample were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). While the filtered (glass wool) DMSO phase was subjected to silica column chromatography (SCC), UV – visible spectrophotometry, thin layer chromatography (TLC) and HPLC.

2.3.2.2. *Silica Column Chromatography- SCC*

The carotenoids extracted in the DMSO phase was fractionated by column chromatography on silica (15 g, 0.06 to 0.2 mm, Merck) developed with solvents of increasing polarity yields ether/hexane (2:8), ether/hexane (1:1) and methanol/ether (1:1) at

18°C as described by Schiedt et al. (1995), except that methanol was included in the last solvent mixture. Six fractions were collected by SCC and further analyzed.

2.3.2.3. *Thin-Layer Chromatography*

The SCC fractions were dissolved in hexane and applied on commercial silica 60 F254 plates 0.25 mm thickness for analytical scale (Merck), using astaxanthin, β -carotene and lycopene as standards (Sigma Chemical, Co., St. Louis, Mo., USA). Chromatography was carried out using a mixture of ethyl acetate/hexane (2.5:1) and 0.44% ether in hexane as mobile phases.

2.3.2.4. *High Performance Liquid Chromatography*

The HPLC separations were carried out using a 300 x 3.9 i.d. mm Water C18 reverse-phase column (15-20 μ m - USA). Chromatographic analyses were conducted on a ÄKTA Purifier equipped with auto-sampler injector, controlled by UNICORN 4.11 software. Chromatography was isocratically performed at 23°C. Mobile phase consisted of acetonitrile, methanol, chloroform and water; 60:25:10:5 (v/v/v/v) (Fontana et al., 2000) at a flow rate of 1.0 mL/min. Between two injections, the column was returned to the initial conditions by applying 25 min methanol, plus 15 min of column conditioning. Injection volume of 50 μ L was used, and detection by light absorbance 480, 455 and 474 nm.

Calibration curves for all the standards were established by injecting ten increasing concentration of pure astaxanthin as standard in the HPLC mobile phase. Peak area for these carotenoids could thus be directly converted into quantities.

2.3.2.5. *UV – Visible Spectrophotometry*

Carotenoids λ_{max} and fine structure of fractions obtained by SCC, HPLC and the standards samples prepared in the mobile phase of HPLC, chloroform and ethanol were determined by UV – Visible spectrophotometry. The wave light range was 340-700 nm. The structure of the chromophore, spectral fine structure (%III/II) is expressed as the ratio of the height of the longest-wavelength absorption peak, designated III, and that of the middle absorption peak (usually $\lambda_{\text{máx}}$), designated II, taking the minimum between the two peaks as baseline, multiplied by 100. In a few cases, III>II, so the value of the %III/II may be slightly greater than 100. For conjugated ketocarotenoids such as canthaxanthin, which give a simple, rounded spectrum with no fine structure, neither peak heights III and II, nor minimum between them, can be defined, so the %III/II value is zero (Britton, 1995).

3. Results and discussion

Total proteolytic activity of LIVAP and 0.5% w/v Alcalase[®] was compared using 1% w/v azocasein as substrate (Table 1). The LIVAP activity was about twice higher than the 0.5% Alcalase[®]. This difference showed to be statistically different (n=4; p<0.001). The carotenoids extractions with proteolytic hydrolysis using LIVAP or 0.5% Alcalase[®] are also displayed in Table 1. The amount of carotenoid extracted using both procedures was not statistically different (n=4, p>0.05). Therefore, the use of LIVAP to enhance the extraction of carotenoids from *L. vannamei* processing waste is economically better than that based on the addition of commercial enzymes. An amount of 43.71 g of crude lipid obtained from the dried carotenoids ethanolic extract was recovered from 1 kg of the shrimp wastes (Table 2). In this ethanolic extract astaxanthin (82,56 µg/g of waste) was identified (Table 3).

The penaeid digestive gland is known to contain high proteolytic activity (Lemos et al., 2000). Trypsin and chymotrypsin are the most abundant proteolytic enzymes in the midgut gland of shrimp, and are responsible for more than 60% of total protein digestion in the midgut gland of penaeids (Muhlia-Almazán et al., 2002). Proteolytic enzymes have been used for isolation of flavoring agents and pigments (Simpson et al., 1998).

For commercial purposes, treatment of biological material such as krill, shrimp or crawfish waste with enzymes (e.g. chitinase or protease) has been used to digest the hard shells to allow more efficient release of astaxanthin and its derivatives by extraction with oil or organic solvents (Schiedt and Liaaen-Jensen, 1995). The high concentrations of chitin and calcium carbonate in shrimp waste interfere with absorption of carotenoids in fish,

making them unsuitable as flesh pigmenting sources for salmonid fishes (Guillou et al., 1995).

Proteolytic hydrolysis is associated with an optimized extraction of carotenoid content (Cano-Lopez et al., 1987). Chen and Meyers (1982) showed that astaxanthin extraction was specifically increased in processed crawfish indicating that it is readily removed from the carotenoid-protein complex, suggesting that covalent bonds probably are not involved in this complex.

Particularly in invertebrate animals the color of specific carotenoid protein complexes is green, purple or blue (Weesie et al., 1995), the gray color of *L. vannamei* suggests the presence of these compounds. Crustacyanins are pigmented proteins frequently found in the exoskeleton of many marine crustaceans, and their blue or purple color comes from the carotenoid astaxanthin (Stainislaw and Britton, 2001). After denaturation, the free carotenoid (prosthetic group of carotenoprotein) exhibits absorption maximum not shown for the parent molecules (Chen and Meyers, 1982). Free carotenoids absorb light in the wavelength range 400-500 nm, and are responsible for many natural yellow, orange or red colors (Weesie et al., 1995).

Extraction methods were reported to release carotenoids from the shell matrix employing edible oils, hydrochloric acid or organic solvents. An enzymatic step to improve the extraction of astaxanthin has also been suggested (Cano-Lopez et al., 1987; Stepnowski et al., 2004). During the hydrolysis process it is possible to separate a high part of the tissue proteins from the carapace, obtaining through strain the carapace with low amount of tissue proteins, and the hydrolisate. The suspended solid (sediment with carotenoids) is then separated by centrifugation from the hydrolisate.

It was observed a high amount of lipid extract containing carotenoids that exhibit a red-orange color. This amount results from the two separated components after the hydrolysis process: suspended pigments still complexed with proteins mixed with lipids and carotenoid esters on shrimp head hydrolyzed surface that during the filtration process attaches on the exoskeleton (probably, due to the lipid nature) and sediment with carotenoids.

The amount of lipid extracted with carotenoids found in *L. vannamei* shrimp head was about four times higher (43.71 mg/g) than the values found in the Northern shrimp (*Pandalus borealis*) waste, 9.27mg/g (Guillou et al., 1995), probably, because of the difference of species or material processing during the studies. *L. vannamei* waste was of fresh head, submitted to proteolytic autolysis before carotenoid extraction process while *P. borealis* was from boiled shrimp.

According to Davies (1976), carotenoids can be divided into two main groups: hydrocarbons, which are called carotenes and oxygen-containing derivatives, which are called xanthophylls. Carotenes are soluble in solvents of low polarity such as hexane and toluene, whereas, xanthophylls in more polar solvents including ethanol and pyridine (Schiedt and Liaaen-Jensen, 1995).

Partition using hexane and DMSO has proved to be ideal for the removal of colorless lipids from animal tissues. The non-esterified hydroxyketocarotenoids, e.g. astaxanthin, are recovered quantitatively from the DMSO phase, while 90% of the lipid remains in the hexane phase (Schiedt and Liaaen-Jensen, 1995). The lipid content of the ethanol extraction of the *L. vannamei* shrimp heads and those of the DMSO and hexane phases are presented in Table 2, which showed a higher concentration in the hexane phase (59%). It was separated about 1g of probable colorless contaminating lipids of the total

hexane phase as precipitate. These results were different from that obtained for skin of Atlantic salmon (*Salmo salar*), which presented a distribution of about 95% in the hexane phase (24.8g) and 5% in the DMSO phase (1.18g) (Schiedt et al., 1995).

The polar DMSO phase probably contained astaxanthin, the main carotenoid of some fish, and most crustaceans (e.g., shrimp, lobster, and crab) (Rodriguez-Amaya, 2001). For such reason this phase was submitted to further analysis by SCC, TLC and HPLC analysis. Six fractions, varying from dark red-orange to orange and light orange, were collected using by SCC and solvents of increasing polarity. Historically, column chromatography is the oldest chromatographic method. With the introduction of paper chromatography, TLC and especially HPLC, column chromatography has lost its importance for the analysis of carotenoids, but remains an indispensable method for separating and purifying carotenoids on a preparative scale (Bernhard, 1995). Castillo and Lenel (1977) using column chromatography with different adsorbents systems found nine fractions to carotenoid extract from crab hermit *Clibanarius erythropus*.

The six purified fractions from *L. vannamei* were analyzed on TLC using three commercial carotenoids as standards: astaxanthin, lycopene and β -carotene (Figure 2). The assays were carried out using two different mobile systems: the first one a more polar system (Figure 2a) that presented three purified bands with the R_f comparable to astaxanthin, and three others bands with higher R_f ; the three unidentified carotenoids were applied on the second lesser polar system (Figure 2b), presenting a R_f not comparable with the standards. These aspects suggested that the unidentified carotenoids presented a less polar character compared with astaxanthin. Nègre-Sadargues et al. (2000) found three bands identified as two different esterified astaxanthin isomers and a free astaxanthin from the deep-sea shrimp *Rimicaris exoculata* employing TLC technology.

From the six fractions obtained by SCC it was possible to confirm three of the last fraction in HPLC system and chloroform and ethanol screened using UV-visible spectrophotometry to confirm the relationship between spectral fine structural (%III/II). The F₄, F₅ and F₆ fractions gave a seemlier simple rounded spectrum, typical represented for astaxanthin, with no fine structure (%III/II value was 0) and 479, 491 and 480 $\lambda_{\text{máx}}$ for HPLC system and chloroform-ethanol, respectively. All results were similar to standard astaxanthin.

The comparison of retention time and absorption spectra with carotenoids standards allowed the characterization of the HPLC analysis. The HPLC chromatogram for crude ethanolic extract (Fig. 3a), hexane phase separated lipid extract (Fig. 3b) and DMSO phase separated lipid extract previously purified by SCC (Fig. 3c) presented similar profile: first peak (I), with similar retention time of the standard astaxanthin and five peaks, section (II), of unidentified carotenoids that did not correspond to the carotenoids standards (Fig. 3). This similarity showed that the method of phase separation did not obtain difference on the carotenoids in the different phases, DMSO and hexane, and that the ethanolic extract is composed by polar carotenoids, that could be confirmed by TLC (Fig. 2). Therefore the method of phase separation is suitable for a preliminary differentiation between carotenes and xanthophylls (Davies, 1976). Those fractions with TLC behavior similar to astaxanthin (F₄, F₅ and F₆) were subsequently analyzed by HPLC and three pure fractions can be seen in Fig. 3c, indicating that even injecting the ethanolic extract direct in HPLC it is possible to separate astaxanthin.

Schiedt et al. (1995) and Guillou et al. (1995) found smaller carotenoids content of 1079 μg for 25 g of lipid extract from salmon skin and 3.99 mg for 9.27 g of lipid extract of cephalothoraxes, digestive glands and shells from boiled shrimp (*Pandalus borealis*) waste,

respectively. Astaxanthin is used in aqua-feeds to impart this natural, pink-red color to farmed salmon fillets, amounts accounting for over 90% of the total carotenoid content have that been found in the flesh of wild salmons (salmon and trout) (López et al., 2004).

The high amount of astaxanthin can be attributed to the chosen analyzed shrimp part (head). Hepatopancreas of necrophagous-carnivorous species is a markedly pigmented organ; the occurrence of carotenoids in the epidermis covering the dorsal eyes indicates storage of pigment resulting very likely from dietary origin, suggesting a determined physiological function (Nègre-Sadargues et al., 2000).

4. Conclusion

This contribution presents an alternative procedure to extract carotenoid from the shrimp *Litopenaeus vannamei* processing waste (heads). Firstly, proteases of the animal themselves (autolysis) were used to enhance the pigment extraction instead of the addition of commercially available enzyme. Afterwards a simple ethanol extraction procedure was able to obtain about 44g of lipid extract containing carotenoids that can be employed directly in aquaculture feeds. Astaxanthin with about 83 µg/g of waste showed to be the most important carotenoid in this preparation as proved by HPLC, TLC and UV-visible spectrophotometry analysis.

5. Acknowledgements

This work was financially supported by SEAP/PR, CNPq, FINEP, UFPE/FACEPE and Japan International Cooperation Agency (JICA). The authors would like to thank MSc. Kilma Paz, Mr. João Virgínio , Mr. Otaviano da Costa and Albérico Santo for their technical assistance. EMPAF Ltd., Brazil, is also thanked for providing the shrimp processing waste.

6. References

- Alencar, R.B., Biondi, M.M., Paiva, P.M.G., Vieira, V.L.A., Carvalho Jr., L.B., Bezerra R.S. 2003. Alkaline proteases from the digestive tract of four tropical fishes. *Braz. J. Food Technol.* 6(2), 279-284.
- Azevedo-Meleiro, C.H., Rodrigues-Amaya, D.B., 2004. Confirmation of identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J. Food Compos. Anal.* 17, 385-396.
- Azevedo-Meleiro, C.H., Rodriguez-Amaya, D.B., 2005. Carotenoids of endive and New Zealand spinach as affected by maturity, season and minimal processing. *J. Food Compos. Anal.* 18, 845-855.
- Bernhard, K., 1995. Chromatography: Part II column chromatography. In: Britton, G., Pfander, H., Liaaen-Jensen, S. (Eds). Vol: 1 A, Isolation and analysis. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 117-130.
- Bezerra, R.S., Abadie-Guedes, R., Melo F.R.M., Paiva, A.M.A., Amâncio-dos-Santos, A., Guedes, R.C.A., 2005a. Shrimp carotenoids protect the developing rat cerebral cortex against the effects of ethanol on cortical spreading depression. *Neurosci. Lett.* 391, 51-55.
- Bezerra, R.S., Lins E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, M.G., Chaves M.E.C., Coelho L.C.B.B., Carvalho L.B.Jr., 2005b. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process. Biochem.* 40, 1829-1834.
- Britton, G., 1995. UV/visible spectroscopy. In: Britton, G., Pfander, H., Liaaen-Jensen, S. (Eds). Volume 1 B: Spectroscopy. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 13-62.

- Cano-Lopez, A., Simpson B.K., Haard N.F., 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from Atlantic cod. *J. Food. Sci.* 52, 503-506.
- Castillo, R., Lenel, R., 1978. Determination and metabolism of carotenoid pigments in the Hermit crab *Clibanarius erythropus* Latreille (1818) [Syn. Cl. *Misanthropus* Heller (1863)]. *Comp. Biochem. Physiol B.* 59, 67-73.
- Chen, H.-M., Meyers, S.P., 1982. Extraction of astaxanthin pigments from crawfish waste using a soy oil process. *J. Food. Sci.* 47, 892-896.
- Davies, B.H., 1976. Analysis of carotenoid pigments. In: Goodwin, T.W. (Ed). *Chemistry and biochemistry of plant pigments*. Academic Press, London and New York. 18, 489-532.
- Fontana, J. D., Mendes, S. V., Persike, D. S., Peracetta, L. F., Passos M., 2000. Carotenóides: cores atraentes e ação biológica. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 40-45.
- Fraser, P.D., Bramley P.M., 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid. Res.* 43, 228-265
- Gildberg, A., Stenberg, E., 2001. A new process for advanced utilization of shrimp waste. *Process Biochem.* 36, 809–812.
- Guillou, A., Khalil, M., Adamounou, L., 1995. Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*. 130, 351-360.
- Kuo, H.-C., Lee, T.-C., Chichester C.O., Simpson, K. L., 1976. The carotenoids in the deep sea red crab, *Geryon quinquedens*. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B, 387-390.

- Lemos, D., Ezquerro, J.M., García-Carreño, F.L., 2000. Protein digestion in penaid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Comp. Biochem. Phys. B.* 186, 89-105.
- López, M., Arce, L., Garrido, J., Ríos, A., Valcárcel, M., 2004. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta.* 64, 726-731.
- Melo, S., 2005. Carcinicultura: uma atividade em busca da sustentabilidade. *Panorama da aquicultura.* 92, p.34-35.
- Muhlia-Almazán, A., Sánchez-Paz, J. A., Yepiz-Plascencia, G., Peregrino-Uriarte A.B., 2002. Influence of molting and starvation on the synthesis of proteolytic enzymes in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Phys. B.* 133, 383-394.
- Nègre-Sadargues, G., Castillo, R., Segonzac, M., 2000. Carotenoid pigments and trophic behaviour of deep-sea shrimps (Crustacea, Decapoda, Alvinocatididae) from a hydrothermal area of the Mid-Atlantic Ridge. *Comp. Biochem. Phys. A* 127, 293-300.
- Rodrigues-Amaya, C.H., 2001. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Press, Washington DC.
- Sachindra, N.M., Mahendrakar, N.S., 2004. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetables oils. *Bioresource. Technol.* 96, 1195-1200.
- Schiedt, K., Bischof, S., Glinz, E., 1995. Isolation of astaxanthin and its metabolites from skin of Atlantic salmon (*Salmo salar*). In: Britton, G., Pfander, H., Liaaen-Jensen, S.

- (Eds). Vol: 1 A, Isolation and analysis. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 243-252.
- Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., 1995. Isolation and analysis. In. Britton, G., Pfander, H., Liaaen-Jensen, S. (Eds). Vol: 1 A, Isolation and analysis. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland. 81-108.
- Simpson, B.K., Nayeri, G., Yaylayan, V., Ashie, I.N.A., 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chem. 61, 131-138.
- Stainislaw, K., Britton G., 2001. A study of protein-carotenoid interactions in the astaxanthin-protein crustacyanin by absorption and Stark spectroscopy; evidence for the presence of three spectrally distinct species. Biochim. Biophys. Acta. 1544, 301-310.
- Stepnowski, P., Ólafsson, G., Helgason, H., Jastorff, B., 2004. Recovery of astaxanthin from seafood wastewater utilizing fish scales waste. Chemosphere. 54, 413-417.
- Su, Q., Rowley, K.G., Balazs, N.D.H, 2002. Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. J. Chromatogr. B. 781, 393-418.
- Weesie, R.J., Askin, D., Jansen, F.J.H.M., Jansen, Groot, H.J.M., Lugtenburg, J., Britton, G., 1995. Protein-chromophore interactions in α -crustacyanin, the major blue carotenoprotein from the carapace of the lobster, *Homarus gammarus* a study by ^{13}C magic angle spinning NMR. Federation of European Biochemical Societies. 362, 34-38.
- Young A.J. Lowe G.M., 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. Arch. Biochem. Biophys. 385, 20-27.

Ytrestoyl, T., Coral-Hinostriza, G., Hatlen, B., Robb, D. H. F., Bjerkeng, B. Carotenoids and lipid content in muscle of Atlantic salmon, *Salmo salar*, transferred to seawater as 0+ or 1+ smolts. Comp. Biochem. Phys. B. 138, 29-4

7. Figures

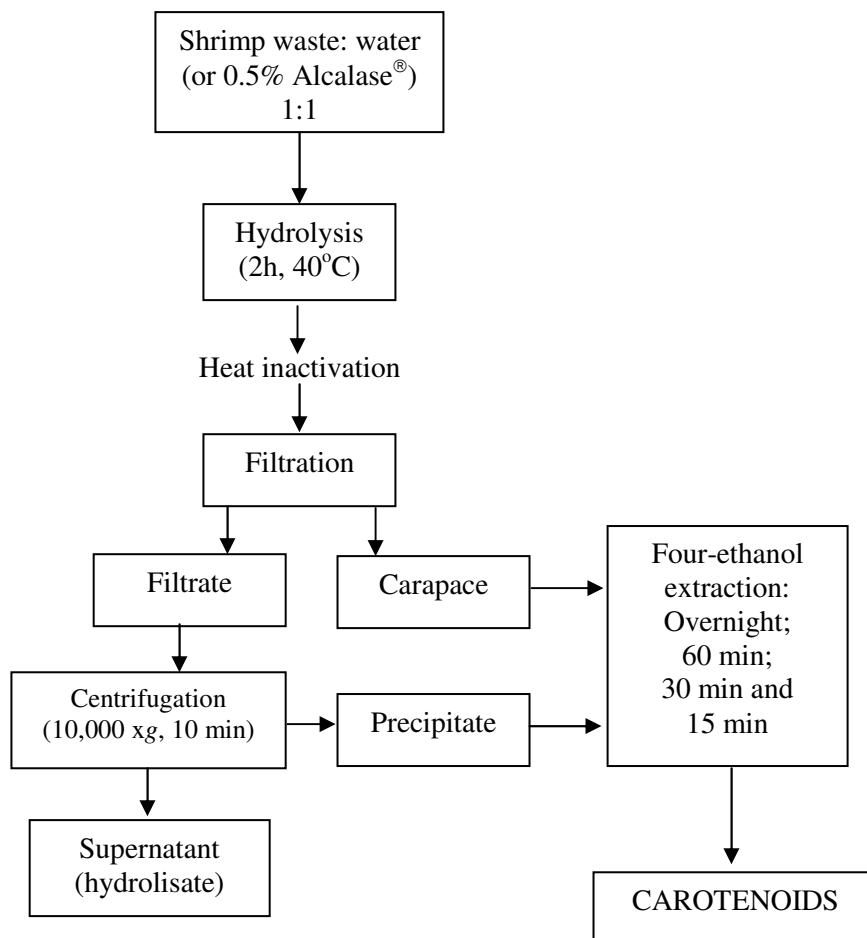


Fig. 1. Flow chart of the carotenoids extraction from *L. vannamei* processing waste adapted from Gildberg and Stenberg (2001).

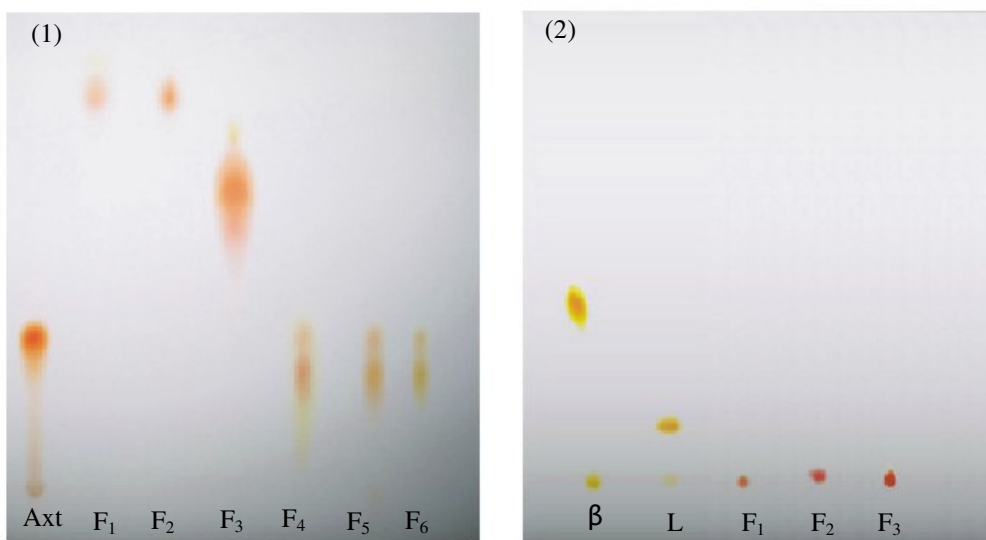


Fig. 2. TLC Comparison of the six fractions of silica column chromatography by ethyl acetate/hexane (2.5:1) system (1) and 0.44% ether in hexane system (2). Axt = astaxanthin standard; β = β -carotene; L = lycopene and F₁ to F₆ = fractions obtained from the silica column chromatography of the lipid extract of the DMSO phase.

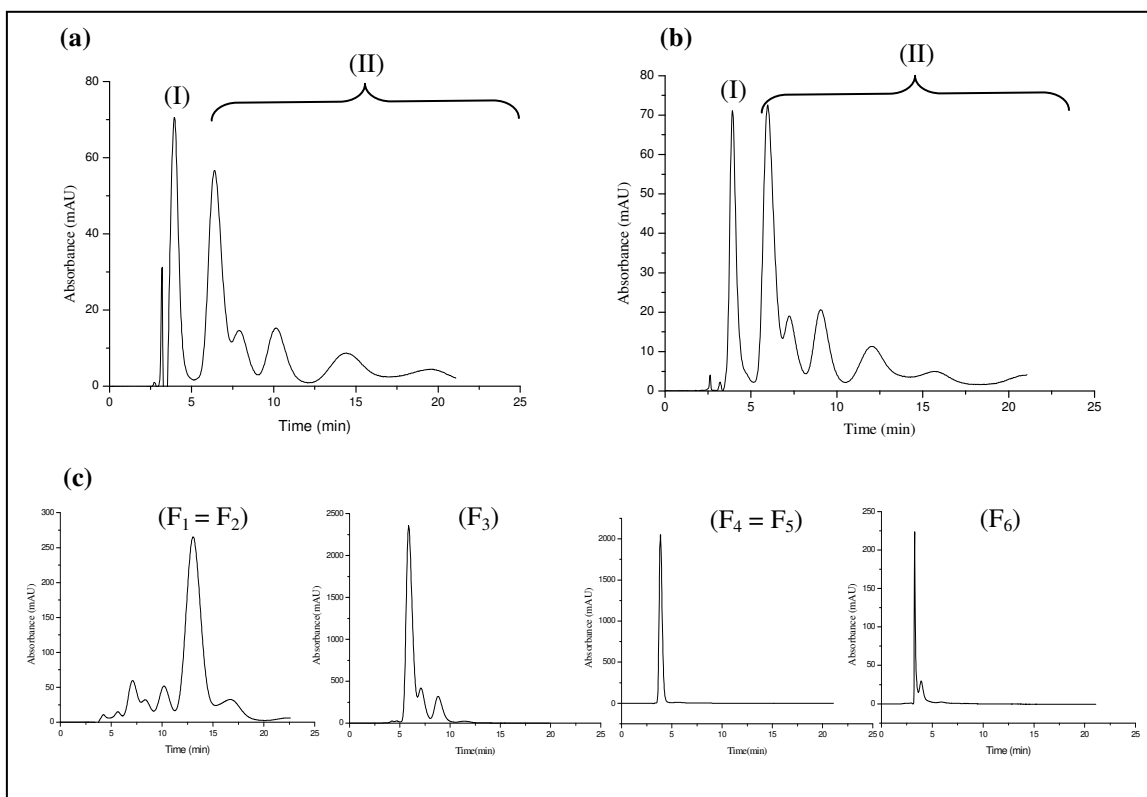


Fig. 3. HPLC carotenoid profile of the ethanol extract (a), the lipid extract in the hexane phase (b) and the lipid extract in the six fractions obtained from the silica column chromatography of the DMSO phase (c). Peak (I) with similar retention time of the standard astaxanthin and section (II) peaks of unidentified carotenoids that did not correspond to the carotenoids standards. For HPLC conditions, *column*: Water C18, 300 x 3.9 i.d. mm reverse-phase column (15-20 μ m - USA) at 23 °C. *Mobile phase*: isocratic (acetonitrile, methanol, chloroform and water; 60:25:10:5, v/v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. Injection: 50 μ L. Detection: 480 nm.

8. Tables

Table 1. Comparison between the shrimp head hydrolysis procedures by autolysis and Alcalase[®]: proteolytic activity and the amount of carotenoids extracted from *L. vannamei* head waste.

Hydrolysis procedure	Proteolytic activity (U)	Carotenoids (mg) ^c
Autolysis ^a	7.4 ± 0.8 ^b	1.22 ± 0.65
Alcalase [®]	2.9 ± 0.3 ^b	0.97 ± 0.19

^a – Autolysis provided by the *Litopenaeus vannamei* proteases (LIVAP).

^b - Values statistically different (n=4; p<0.001)

^c - Amount of carotenoids extracted from 30g of shrimp processing waste

Table 2. *L. vannamei* lipids extracted by ethanol and hexane/DMSO partitioned from 1 kg shrimp head.

Lipid of Shrimp Head	[Lipid Extract] (g/kg)	Yield [%]
<i>Crude Lipid</i>		
Ethanol extract	43,71	100
<i>Phase separated</i>		
Hexane phase extract	25,62	59
DMSO phase extract	17,18	39

The carotenoids were concentrated under vacuum at 37°C using a rotary flash evaporator and partitioned in hexane/dimethyl sulphoxide (DMSO) and evaporated again.

Table 3. Carotenoids content in ethanolic lipid extract from shrimp (*L. vannamei*) processing waste.

Ethanolic Lipid Extract of Shrimp Head	Concentration (µg/g)
Total Carotenoids (HPLC)	194,52 ± 0.51
Unidentified Carotenoids (HPLC)	111,96 ± 0.81
Astaxanthin (HPLC)	82,56 ± 0.21

*Quantified by HPLC using a Water C18, 300 x 3.9 i.d. mm reverse-phase column (15-20 µm - USA) at 23 °C. *Mobile phase*: isocratic (acetonitrile, methanol, chloroform and water; 60:25:10:5, v/v/v/v) at a flow rate of 1.0 mL/min. Injection: 50 µL. Detection: 480 nm.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta um processo alternativo para a extração de carotenóides do resíduo do processamento (cabeça) do camarão *Litopenaeus vannamei*. Primeiramente, foram utilizadas proteases da própria cabeça de camarão (autólise) para aumentar a extração de pigmentos carotenóides ao em vez da adição de enzimas comerciais. Posteriormente através de um simples processo de extração com etanol foi possível obter 44g de extrato lipídico contendo carotenóides que podem ser empregados diretamente em rações na aquicultura. Astaxantina com 83 µg/g de resíduo demonstrou ser o mais importante carotenóide nesta preparação identificado através de CLAE, CCD e análise do espectro de absorção UV-visível.

6. ANEXO

CHEMOSPHERE

Persistent Organic Pollutants and Dioxins Editors:

H. Fiedler, L.L. Needham

See [editorial board](#) for all editors information

- [Volumes / Issues](#) (Tables of Contents, Abstracts, Full Text), including Articles in Press
- [Guide for Authors](#)
- [Most downloaded articles](#)

Note to Contributors: Online submission is now available for this journal. To submit your article online, go to:  <http://ees.elsevier.com/chem>

Related links

 <http://www.treatiseongeochimistry.com> - from the chemistry of the solar system to environmental geochemistry. 10 Volumes. Publication 2003.



To register for our FREE bimonthly e-newsletter, [Click here](#)

Description

Chemosphere is an international journal designed for the rapid publication of original communications as well as review articles. Chemosphere, as a multidisciplinary journal, offers maximum dissemination of investigations related to all aspects of environmental science. Chemosphere will publish:

- Original communications describing important new discoveries or further developments in important fields of investigation related to the environment and human health
- Reviews, mainly of new developing areas of environmental science
- Special, themed issues on relevant topics.

The following sections and subject fields are included:

Persistent Organic Pollutants and Dioxins

- All papers related to persistent organic pollutants Dioxin conference proceedings are published annually.

Environmental Chemistry

- Environmental fate: transport, biodegradation, bio-accumulation, photochemistry etc.
- Environmental Analysis
- Application of environmental modelling/QSAR
- Water and soil chemistry
- Monitoring studies; only if they present new findings or interpretations of general interest for an international readership. Simple site monitoring using standard methodology will not be considered.

Environmental Toxicology and Risk Assessment

- Ecotoxicology: aquatic and terrestrial
- Animal toxicology
- Endocrine disruptors
- Epidemiology
- Biochemistry
- Pharmacokinetics/metabolism

- Testing methods
- Occupational Hazards and Exposure

Science for Environmental Technology

- Advanced waste and wastewater treatment process
- Incineration
- Remediation
- Hazardous Waste – industrial chemicals
- Green Chemistry

Bibliographic & ordering Information

ISSN: 0045-6535

Imprint: PERGAMON

Commenced publication 1972

Subscription for the year 2006, Volumes 62-65, 44 issues

Also available as part of the [Environmental Science Package - Option 2](#)

Associated personal price: [Order form](#)

USD 490 for all countries except Europe and Japan

EUR 439 for European countries

JPY 58,400 for Japan

Institutional price: [Order form](#)

JPY 554,600 for Japan

USD 4,671 for all countries except Europe and Japan

EUR 4,175 for European countries

See also information about [conditions of sale & ordering procedures](#), and links to our [regional sales offices](#).

For an overview of recent dispatched issues, see the Journal issue [dispatch dates](#)

Combined subscriptions

[Environmental Science Package - Option 2](#)

Audience

Environmental scientists, chemical engineers, biologists, toxicologists.

Abstracting / indexing

Get an overview of [abstracting and indexing information](#).

Impact factor of this journal

2004: 2.359 Impact factor has increased from 1.904 in 2003.

Journal Citation Reports® 2004, published by Thomson Scientific

070/711

Last update: 31 Jan 2006

Guide for Authors

Submission of Papers

From now on, all manuscripts should be submitted electronically through Elsevier Editorial System (EES) which can be accessed at <http://ees.elsevier.com/chem>

With the submitted manuscript authors are requested to **provide full contact details of four potential reviewers** including email addresses. The suggested reviewers should not be people at the same institution as the author, Chemosphere Editors or Editorial Board members, and at least two should be from other geographic regions.

During submission papers should be marked for the attention of a subject Editor or the relevant section, if possible. Failure to provide this information will significantly delay processing of the manuscript.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, and/or similar content, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher. By the same token, papers previously published in proceedings or any other journal in any other language should not be submitted without significant modification.

Types of Contributions

Chemosphere accepts Research Papers, Review Papers, Short Communications, Letters to the Editor, Replies and Discussion Papers. Please note that papers with a routine nature and lacking originality, novelty and uniqueness will not be accepted for publication.

A Short Communication should be of significant scientific merit (a novel finding that warrants immediate publication).

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be in double-spaced form with wide margins. A font size of 12 pt is required. The corresponding author should be identified (include a Full postal address, Fax number and E-mail address). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

Line Numbers: To facilitate the review process line numbers should be inserted in the text of the manuscript.

Paper Length: The Editors generally encourage brevity for all Research Papers. Short Communications must not exceed 4 printed pages and will be given priority for rapid publication. Research papers should not exceed 6000 words. Word counts include text, references, figures and tables. Each figure or table should be considered equal to 300 words. The number of figures and/or tables should not exceed seven. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections.

Abstracts: Abstracts should not exceed 250 words, and should not contain any references.

Keywords: 4-6 keywords must be included on a separate line below the main abstract and labelled 'Keywords'. To optimise searching, avoid key words already used in the title.

Text: Follow this order when composing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Text, Acknowledgements, Appendix, References, Figure Captions, Figures and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Units: Use SI Units. If other units are necessary, include the conversion factor and add the non-standard unit in parenthesis. Units should be in the form, e.g. g cm⁻¹ rather than g/cm.

Symbols: Define in text. Place extensive list of symbols in an appendix.

Maths: Avoid double suffix. Punctuate carefully. Stack numerators over denominators e.g.

$$\frac{dy}{dx}$$

and not $dy/dx = a + bx$.

Abbreviations: Please follow the standard guide for abbreviation as given in "Guidelines for use of technical abbreviations and acronyms in Chemosphere" at http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/362abbreviations.htm.

References: All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to: The author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that..." or "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994; Tusseau-Vuillemin *et al.*, 1998; Brito and Melo, 1999)"). Please follow the chronological order. For three or more authors use the first author followed by "*et al.*" in the text.

The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The Harvard system of references must be used. International abbreviations should be used for journal names as determined by ISI. For a listing please refer to: <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations>. References should therefore be given in the following form:

Journal article: Tusseau-Vuillemin, M., Mortier, L., Herbaut, L., 1998. Modeling nitrate fluxes in an open coastal environment: Transport versus biogeochemical processes. *J. Geophys. Res.* 103, 7693-7708.

Book: Cressie, N., 1991. *Statistics for Spatial Data*. John Wiley, New York.

Article or chapter in edited book: Jeffries, P., Barea, J.M., 1994. Biochemical cycling and arbuscular mycorrhizas in the sustainability of plant-soil systems. In: Gianinazzi, S., Schuepp, H. (Eds.). *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Systems*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 101-115.

Format for personal communication: Smith, J., Personal communication.

References to personal correspondence or to unarchived material obtained from the World Wide Web are discouraged. "Anonymous" is not acceptable as an author. Citations in other languages are discouraged.

Illustrations:

- All illustrations must be readable when reduced to a width of 75 mm (single column figure) or 160 mm (double column figure)
- Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text.
- All illustrations should be clearly marked with the figure number. All figures are to have a caption.
- *Line drawings:* Lines should be black, of an adequate thickness (around 1 pt) and curves should be smooth. Particularly, lines of spectra should be of sufficient thickness. Shading (tints) that simulate grey should not be used and replaced by line shading (hatched)

Photographs: Photographs are to be avoided, if possible. Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable

Colour: Colour illustrations will be accepted; however, the authors will be expected to make a contribution towards the extra printing cost.

Apply to the Author Services at the Publisher for details of cost. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e.g. in graphs).

Multimedia Files: Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article on Science Direct: <http://www.sciencedirect.com/>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Miscellaneous

Be careful about the use of significant figures; provide concise description about QA/QC of your data; use periods for your decimal points; define acronyms when they first appear in the text; be consistent in the format of your unit expressions.

Language editing

Information on author-paid and pre-accept language editing services available to authors can be found at <http://authors.elsevier.com/LanguageEditing.html>.

Authors in Japan kindly note: upon request Elsevier Japan will provide a list of people who can check and improve the English of an article (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier Japan K.K., 1-9-15 Higashi Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; tel.: +81-3-5561-5032; fax: +81-3-5561-5045; e-mail: jp.info@elsevier.com.

Proofs

PDF proofs will be sent by e-mail to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.

Offprints

25 offprints will be supplied free of charge. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints (produced after publication of an article) will incur a 50% surcharge.

Copyright

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, without the author relinquishing his/her proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of a similar nature, and translations. It also includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any material for which copyright already exists.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Online Publication

Your article will appear on Elsevier's online journal database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks of acceptance. Articles in Press for this journal can be viewed at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00456535>. An Article in Press may be cited prior to its publication by means of its unique digital object identifier (DOI) number, which does not change throughout the publication process.

Author Services

For queries relating to the submission of articles (including electronic submission) and the status of accepted manuscripts, please contact Author Services, Log-in Department, Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK. E-mail: authors@elsevier.co.uk, Fax: +44 (0) 1865 843905, Tel: +44 (0) 1865 843900.

Authors can also keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's [Author Gateway](#).