



**Universidade Federal de Santa Catarina**

**Centro de Ciências Biológicas**

**Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências**

**PROSPECÇÃO DE CAROTENOIDES EM DIATOMÁCEAS  
(BACILLARIOPHYCEAE): ÊNFASE EM FUCOXANTINA**

**Claudia Marlene Bauer**

**Orientador: Dr. Marcelo Maraschin**

**Coorientador: Dr. Leonardo Rubi Rörig**

**Florianópolis  
2016**

Claudia Marlene Bauer

**PROSPECÇÃO DE CAROTENOIDES EM DIATOMÁCEAS  
(BACILLARIOPHYCEAE): ÊNFASE EM FUCOXANTINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Dr. Marcelo Maraschin

Coorientador: Dr. Leonardo Rubi Rörig

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bauer, Claudia Marlene  
Prospecção de carotenoides em diatomáceas  
(BACILLARIOPHYCEAE): ênfase em fucoxantina / Claudia  
Marlene Bauer ; orientador, Marcelo Maraschin ;  
coorientador, Leonardo Rubi Rôrig. - Florianópolis, SC, 2016.  
78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

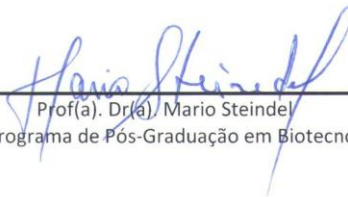
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Carotenoides. 3.  
Cromatografia. 4. Diatomáceas. 5. Óleos vegetais. I.  
Maraschin, Marcelo. II. Rôrig, Leonardo Rubi. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

**"Prospecção de carotenoides em diatomáceas (BACILLARIOPHYCEAE): ênfase em fucoxantina"**

Por

**Cláudia Marlene Bauer**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (05/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

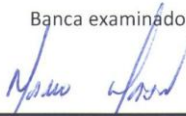


---

Prof(a). Dr(a) Mario Steindel

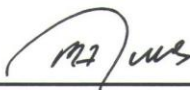
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



---

Dr(a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



---

Dr(a) Rosendo Augusto Yunes (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) José Bonomi Barufi (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Virgílio Gavicho Uarroa (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2016.



Dedico este trabalho aos meus pais Othmar e Karin.





## AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais Othmar e Karin pelo amor e pelo apoio.

Aos meus sempre companheiros Henrique, Fernando, Georgea, Caio e Januario.

Ao professor Marcelo Maraschin pela orientação, pelas sugestões e por disponibilizar os recursos tecnológicos e humanos para realização deste trabalho.

Ao professor Leonardo Rubi Rörig pelo apoio, orientação e sugestões.

Ao professor Roberto Bianchini Derner e Rafael Garcia Lopes por fornecerem as espécies indispensáveis para realização deste trabalho.

A Rafaela Gordo Corrêa pelo companheirismo e apoio técnico.

A Eva Regina de Oliveira Rodrigues e Fernanda Ramlov pelos ensinamentos e pelo companheirismo.

Aos companheiros do LMBV, um grupo sem igual.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, pela oportunidade de aprendizado e pesquisa.

A CAPES pela concessão da Bolsa de estudos.

Muito Obrigada!



“Em algum lugar, algo incrível espera para ser conhecido”.

**Carl Sagan**



## RESUMO

Os compostos gerados pelo metabolismo desempenham uma função importante na prevenção e cura de doenças, movimentando a cadeia produtiva, gerando produtos e novas tecnologias também para outros fins como o desenvolvimento de materiais, agricultura, corantes e biocombustíveis. Os carotenoides ocupam uma parcela significativa neste contexto, como matérias-primas às indústrias química e farmacêutica. São produzidos por plantas vasculares e algas, ainda que alguns compostos sejam encontrados somente em algas, como a fucoxantina, um oxicarotenoide constituinte de diversos produtos, e.g., suplemento alimentar. Este metabólito secundário tem sido pesquisado ao tratamento e prevenção de patofisiologias importantes como o câncer, o diabetes e a obesidade. Dessa forma, este trabalho avaliou o potencial de produção de carotenoides das espécies de diatomáceas, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans* e *Thalassiosira fluviatilis*, utilizando para extração solventes orgânicos (**etapa I** - MeOH) e, posteriormente, óleos vegetais (**etapa II** - canola, gergelim, girassol, milho, arroz, uva, soja, algodão e café verde). A purificação e análise dos compostos extraídos em MeOH foi realizada por métodos cromatográficos (coluna aberta, CCD e CLAE), e a detecção e quantificação por espectrofotometria UV-vis, CLAE e espectrometria de massa. Os resultados mostraram a presença de fucoxantina nos organismos em estudo e apontaram *P. tricornerutum* como a espécie de maior potencial como fonte de fucoxantina em relação as demais espécies investigadas. Os protocolos de extração e purificação daquele pigmento se mostraram eficientes, podendo ainda ser otimizados. Por fim, a extração de fucoxantina com óleos vegetais se mostrou viável, porém com menor rendimento em relação aos organossolventes. Os óleos de canola, café verde e arroz se destacaram na extração de compostos carotenóidicos da espécie *P. tricornerutum*. Para *T. fluviatilis*, os maiores rendimentos de extração foram obtidos com óleos de gergelim, uva e café verde e para *C. muelleri* com óleos de gergelim, girassol e milho. Os compostos extraídos se mostraram estáveis por 90 dias, quando armazenados a -20°C e -80°C. À temperatura ambiente, o óleo de canola provou ser eficiente em estabilizar os carotenoides em solução por 30 dias. Os extratos secos armazenados à temperatura ambiente se mostraram alterados já nos primeiros dias, não sendo, portanto, uma forma recomendável de armazenamento dos pigmentos carotenóidicos.

**Palavras-chave:** Carotenoides; cromatografia; diatomáceas, fucoxantina; óleos vegetais, perfil metabólico.

## ABSTRACT

Compounds generated by metabolism play an important role in preventing and curing diseases and strongly move the production chain generating products and new technologies, also for other purposes such as new materials, agriculture, dyes, and biofuels. Carotenoids play an important role in this context, particularly as raw materials for the chemical and pharmaceutical industries. They are produced by both vascular plants and algae, however, some compounds are only found in algae as fucoxanthin, an oxocarotenoid present in various products, e.g., food dietary. This secondary metabolite has been investigated for the treatment and prevention of major pathophysiologies such as cancer, diabetes, and obesity. Thus, this study determined the potential of production of carotenoids in the species of diatoms, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros muelleri*, *Chaetoceros calcitrans*, and *Thalassiosira fluviatilis*, using organic solvents extraction (**stage I** - methanol) and later, vegetable oils (**stage II** - canola, sesame, sunflower, corn, rice, grape, soybean, cotton, and green coffee). Purification and analysis of compounds extracted in methanol was carried out by chromatographic methods (open column, TLC, and HPLC) and detection and quantification by UV-vis spectrophotometry, HPLC, and mass spectrometry. The results showed the presence of fucoxanthin in the organisms under study and pointed to *P. tricornutum* as the species with the greatest potential as source of fucoxanthin, regarding the other species investigated. Extraction and purification protocols of the pigment showed to be effective and may be optimized. Finally, fucoxanthin extraction with vegetable oils proved to be feasible, albeit with lower yields compared to organosolvents. Canola, green coffee, and rice oils allowed higher carotenoid yields for *P. tricornutum*. For *T. fluviatilis*, the highest recoveries were found with sesame oil, grape, and green coffee oils, as for *C. muelleri* superior yields were achieved using sesame, sunflower, and corn oils. The extracted compounds were stable for at least 90 days when stored at -20° C and -80° C. At room temperature, canola oil proved to be effective in stabilizing carotenoids for at least 30 days. Dried extracts stored at room temperature showed changes in the first days of storage.

**Keywords:** Carotenoids; chromatography; diatoms; fucoxanthin; metabolic profile, vegetable oils.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da fucoxantina.....29
- Figura 2.** Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de *P. tricornutum* (PTR), *T. fluviatilis* (TFL), *C. muelleri* (CMU) e *C. calcitrans* (CCA), previamente solubilizados em acetato de etila, e eluídos em fase móvel de hexano:acetona(6:4, v/v). Os padrões de betacaroteno e fucoxantina são mostrados com valores de Rfs de 0,99 e 0,57, respectivamente.....43
- Figura 3.** Cromatografia em coluna aberta em sílica gel da fração rica em fucoxantina do extrato de *P. tricornutum*, revelando a presença e a separação de carotenoides nas frações amarela e laranja e de clorofila *a* na fração de cor esverdeada. Eluição realizada em fase móvel de hexano: acetona (6: 4, v/v).....45
- Figura 4.** Perfil cromatográfico (CLAE,  $\lambda = 450$  nm) das frações metanólicas purificadas de *P. tricornutum* (PTR), *T. fluviatilis* (TFL), *C. muelleri* (CMU) e *C. calcitrans* (CCA), evidenciando o pico de fucoxantina ( $R_t = 3,7$  min).....50
- Figura 5.** Espectros de massa (modo positivo, 50-3000  $m/z$ ) das frações metanólicas purificadas de *P. tricornutum* (PTR), *T. fluviatilis* (TFL), *C. muelleri* (CMU) e *C. calcitrans* (CCA). Valores de fragmentação 581,40  $m/z$ , 681,41  $m/z$  e 641,42  $m/z$  correspondendo, respectivamente, aos íons  $[M+H-H_2O-AcOH]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+H-H_2O]^+$ , em que  $[M]^+$  se refere ao íon molecular.....52
- Figura 6:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de *P. tricornutum* em óleo de canola, segundo os processos de extração.....58
- Figura 7:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos metanólicos secos de *P. tricornutum*, em três momentos de armazenamento em temperatura ambiente, à  $-20^\circ\text{C}$  e à  $-80^\circ\text{C}$ .....60
- Figura 8:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de *P. tricornutum* em MeOH, em três momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente,  $-20^\circ\text{C}$  e  $-80^\circ\text{C}$ .....61
- Figura 9:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de *P. tricornutum* em óleo de canola, em três momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente,  $-20^\circ\text{C}$  e  $-80^\circ\text{C}$ .....62
- Figura 10:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos secos de fucoxantina extraída e purificada de *P. tricornutum*, em três momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente,  $-20^\circ\text{C}$  e  $-80^\circ\text{C}$ .....63
- Figura 11:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de fucoxantina em MeOH, extraída e purificada de *P. tricornutum*, em três

momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente, -20°C e -80°C.....64

**Figura 12:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de fucoxantina em óleo de canola, extraída e purificada de *P. tricornutum*, em três momentos diferentes, armazenados em temperatura ambiente, -20°C e -80°C.....65

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Concentrações de carotenoides totais (mg/g matéria seca, n=3) de extratos metanólicos de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis* determinadas por espectrofotometria UV-visível ( $\lambda = 450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).....42
- Tabela 2:** Quantificação de fucoxantina (mg/g biomassa seca, n=3) de extratos metanólicos brutos de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis* determinadas por CLAE-UV-Vis. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).....46
- Tabela 3:** Concentração (mg/g matéria seca) e pureza (%) de fucoxantina (n=3) em frações metanólicas purificadas de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis* determinadas por CLAE. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).....49
- Tabela 4:** Absorbâncias (n=3) dos extratos em óleos vegetais de *P. tricornutum* (PTR), *C. muelleri* (CMU) e *T. fluviatilis* (TFL), determinadas por espectrofotometria Uv-visível ( $\lambda = 450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferenciam médias entre diferentes óleos e letras maiúsculas entre as espécies..... 54
- Tabela 5:** Teor de carotenoides totais (mg/g de matéria seca) dos extratos em óleo de canola de *P. tricornutum*, consoante aos tempos de extração á 28°C (n=3), determinado por espectrofotometria UV-vis ( $\lambda = 450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ )..... 56
- Tabela 6:** Conteúdo de carotenoides totais (mg/g matéria seca) dos extratos de *P. tricornutum* em óleo de canola, ao longo de três períodos amostrais. A extração dos pigmentos foi assistida por microondas (n=3) e os teores determinados por espectrofotometria UV-vis ( $\lambda = 450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).....57
- Tabela 7:** Carotenoides totais (mg/g matéria seca) de extratos metanólicos e em óleo de canola de *P. tricornutum* (n=3), conforme o tempo de extração. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferenciam médias entre diferentes tempos e letras maiúsculas diferenciam os tratamentos de MeOH e óleo de canola.....59



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANOVA:** Análise de Variância.

**CCD:** Cromatografia em Camada Delgada.

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

**GGPP:** Geranyl-geranyl pirofosfato.

**LC/MS:** Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

**LMBV:** Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal.

**MeOH:** Metanol.

**mg:** Miligrama.

**mg g<sup>-1</sup> ms:** Miligrama(s) por grama de matéria seca.

**min:** Minutos.

**mL:** Mililitro.

**m/z:** Razão massa/carga do íon

**nm:** Nanômetro.

**Rf:** Fator de Retenção.

**TR:** Tempo de Retenção.

**UV-vis:** Ultravioleta-visível.

**μL:** Microlitro.



## SUMÁRIO

Introdução.....	25
1. Revisão Bibliográfica.....	27
1.1. Carotenoides.....	27
1.2. Fucoxantina.....	28
1.3. Diatomáceas.....	30
1.4. Óleos vegetais e extração de carotenóides de microalgas.....	33
2. Objetivos.....	34
2.1. Objetivo geral.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. Material e métodos.....	34
3.1. Obtenção e armazenamento da biomassa.....	35
3.2. Extração dos carotenoides utilizando solvente orgânico.....	35
3.3. Espectrofotometria de varredura UV-Visível.....	36
3.4. Quantificação de carotenoides totais.....	36
3.5. Purificação dos extratos em organossolvente.....	36
3.6. Cromatografia em camada delgada.....	37
3.7. Cromatografia líquida em coluna aberta de sílica gel.....	37
3.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	38
3.9. Espectrometria de massa.....	38
3.10. Extração de carotenóides com óleos vegetais.....	39
3.11. Otimização da extração de carotenóides com óleos vegetais.....	39
3.11.1. Extração à 28°C com intervalos de tempos amostrais.....	39
3.11.2. Extração assistida por micro-ondas.....	40
3.11.3. Extração assistida por ultrassom.....	40
3.12. Análise comparativa dos rendimentos de extração em solvente orgânico e em óleos vegetais.....	40
3.13. Estabilidade dos compostos carotenoidicos.....	40
3.14. Análises estatísticas.....	41

4. Resultados e discussão.....	41
4.1. Quantificação de pigmentos carotenoidicos nos extratos organossolventes por espectrofotometria UV-vis.....	41
4.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	42
4.3. Cromatografia líquida em coluna aberta de sílica.....	44
4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos brutos.....	45
4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das frações ricas em fucoxantina.....	48
4.6. Espectrometria de massa.....	51
4.7. Extração de carotenoides com óleos vegetais.....	53
4.8. Otimização da extração de carotenoides com óleos vegetais.....	54
4.8.1. Tempo de extração à 28°C.....	55
4.8.2. Extração assistida por microondas.....	56
4.8.3. Extração assistida por ultrassom.....	57
4.8.5. Perfis cromatográficos de extratos em óleo de canola.....	57
4.9. Análise comparativa dos rendimentos de extração em solvente orgânico vs óleo vegetal.....	58
4.10. Estabilidade dos compostos carotenoidicos.....	59
4.10.1. Estabilidade de extratos brutos.....	60
4.10.2. Estabilidade da fração purificada de fucoxantina.....	62
5. Conclusões.....	67
6. Referências bibliográficas.....	69
7. Anexos.....	77



## Introdução

Uma das características dos seres vivos é sua atividade metabólica. Os compostos gerados pelo metabolismo vegetal, animal, de algas e de microorganismos, desempenham uma função importante na prevenção e cura de doenças movimentando fortemente a cadeia produtiva. Inúmeros produtos e novas tecnologias são desenvolvidos, não somente para este fim, como também à geração de suplementos à agricultura, corantes e biocombustíveis, por exemplo.

Os produtos do metabolismo são divididos em metabólitos primários e secundários. O que os diferencia é que estes últimos não são necessariamente imprescindíveis ao funcionamento normal dos organismos vivos, embora bem importantes, possuindo por sua vez uma diversidade que varia enormemente entre diferentes espécies, raças e cultivares, além do que, sua formação está também sujeita às condições ambientais diversas, à sazonalidade, ao estágio de desenvolvimento, podendo variar inclusive ao longo do dia, i.e., ritmo circadiano.

Com relação aos carotenoides utilizados em suplementos, algumas fontes naturais a serem citadas podem ser a alga *Dunaliella salina*, o fungo *Blakeslea trispora*, a palmeira *Elaeis guineensis* e a cenoura como fontes de betacaroteno, o tomate e o fungo *Blakeslea trispora* como fontes de licopeno, as flores de *Tagetes erecta* como fonte de luteína e a alga *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina (MORTENSEN, 2009). No entanto, as algas, apesar de estarem presentes na alimentação humana há milênios, só recentemente receberam maior atenção como fonte de compostos bioativos para formulação de produtos (CHOJNACKA *et al.*, 2015). Sendo assim, apresentam um vasto campo de possibilidades tecnológicas a explorar, tendo se mostrado como fontes potenciais de compostos de alto valor que compreendem a produção de fármacos, cosméticos, corantes e polímeros, além de outros.

Pelo exposto, este estudo se volta à prospecção de compostos do metabolismo secundário nas espécies de microalgas marinhas *Phaeodactylum tricorutum*, *Thalassiosira fluviatilis*, *Chaetoceros muelleri* e *Chaetoceros calcitrans*, com ênfase em carotenoides, para avaliar novas potencialidades biológicas à produção desses compostos.



## 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. Carotenoides

O interesse nos carotenoides despertou há cerca de 80 anos, quando se demonstrou, pela primeira vez, a ligação entre o metabolismo de betacaroteno e a biossíntese de vitamina A. Naquela oportunidade, a importância do betacaroteno e de alguns outros carotenoides na dieta como pró-vitamina A foi estabelecida (BRITTON *et al.*, 2009).

Em função de sua estrutura química, os carotenoides pertencem à classe dos terpenos, os quais são classificados, segundo sua biogênese, de acordo com o seu número de unidades do hidrocarboneto isopreno, cuja forma molecular é  $C_5H_8$  (RAVEN *et al.*, 2007).

Na via de biossíntese, os precursores dos terpenos são os isômeros interconversíveis isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que se condensam através da ação das prenil-transferases, formando os precursores da maioria das famílias de terpenos (CROZIER *et al.*, 2006).

Carotenoides podem ser sintetizados em dois compartimentos celulares, a saber nos cloroplastos e nos cromoplastos de plantas e algas, pela via metil-eritritol-4-fosfato, a partir da condensação de duas moléculas de geranyl-geranyl pirofosfato (GGPP), produzindo fitoeno (JEFFREY *et al.*, 1997). Esta rota metabólica mostra-se ausente em animais superiores, leveduras e fungos. O fitoeno é desidrogenado a licopeno que a partir deste ponto pode formar: *i.*  $\alpha$ -caroteno e luteína, ou *ii.* betacaroteno e as xantofilas zeaxantina e violaxantina. Nesta última, ocorre o ciclo das xantofilas, em que a interconversão de zeaxantina e violaxantina tem um papel importante na proteção de tecidos verdes quando há excesso de radiação, através da dissipação do excesso de energia (HUMPHREY, 2006).

Carotenoides são pigmentos solúveis em organossolventes, apresentando colorações que variam do amarelo ao vermelho e que dividem-se em dois grupos: *i.* os carotenos, moléculas constituídas somente por carbono e hidrogênio; e *ii.* as xantofilas que possuem também oxigênio em sua estrutura. É reconhecida a sua atuação como pigmentos acessórios das clorofilas, captando a energia na região espectral em que estas pouco absorvem, e transferindo-a aos centros de reação do fotossistema II (MATHEWS-ROTH 1997, LESSER 2006). Atuam também como fotoprotetores do aparato fotossintetizante contra danos oxidativos, através do sequestro do excesso de energia

(*quenching*) do triplete da clorofila, evitando assim a formação de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) (UENOJO *et al.*, 2007).

Com relação à saúde humana, os carotenoides estão envolvidos na prevenção de doenças degenerativas devido à sua propriedade antioxidante (ROMER *et al.*, 2002), a qual resulta do número de duplas ligações conjugadas em suas estruturas química, bem como de sua apolaridade (TAPIERO *et al.*, 2002, BARREIROS *et al.*, 2006). Este sistema conjugado de duplas ligações é rico em elétrons presentes na cadeia poliênica dos carotenoides, atua na absorção do oxigênio singleto e também de radicais livres, sendo responsável pela atividade antioxidante dos carotenoides (MCNULTY *et al.*, 2007).

Atualmente, são vendidos por ano cerca de US\$ 300 milhões em carotenoides sintéticos, sendo que o preço de mercado fica em torno de R\$ 57 para um grama de betacaroteno, R\$ 633 para uma grama de astaxantina e R\$ 1690 o grama de zeaxantina (VALDUGA *et al.*, 2009). Como os pigmentos produzidos por métodos biológicos têm surgido como um crescente segmento do mercado industrial (VALDUGA *et al.*, 2009), a existência de um mercado de produtos naturais, aonde carotenoides apresentam relevante destaque, em paralelo à contraparte derivada de vias de síntese química, justifica a produção destes compostos por organismos em sistemas controlados. Neste contexto, dois fatores concorrem positivamente ao segmento de mercado de carotenoides naturais, a saber: *i.* as formas estruturais *cis* e *trans* têm propriedades diferenciadas e nem sempre é possível obtê-las sinteticamente; *ii.* um segmento crescente do mercado prefere consumir produtos naturais, rejeitando formas sintéticas (LOURENÇO, 2006). Aliado a este fato, D'ORAZIO *et al.* (2012) ressaltam a barreira imposta por custos mais altos de obtenção dos produtos na forma sintética.

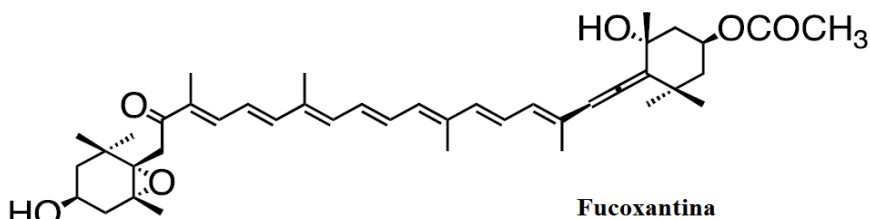
Mais de 750 carotenoides já foram identificados e caracterizados estruturalmente na natureza, oriundos de plantas, algas, bactérias, fungos e animais. A exceção destes últimos que não apresentam vias biossintéticas destes metabólitos secundários, se observa uma ampla diversidade de tipos daqueles metabólitos, sendo alguns utilizados inclusive como marcadores quimiotaxonômicos, como no caso da fucoxantina encontrada, principalmente, ou ainda tão somente, de algas pardas e diatomáceas (TAKAICHI, 2011).

## 1.2. Fucoxantina

A fucoxantina (**Figura 1**) está compreendida no grupo das xantofilas. De interesse, estima-se que este carotenoide seja um dos

mais abundantes na natureza, contribuindo com 10% do total daqueles pigmentos (MATSUNO, 2001).

**Figura 1.** Estrutura química da fucoxantina.



Fonte: TAKAICHI, 2011.

Diversos trabalhos relatam a atividade biológica da fucoxantina. Além da atividade antiobesidade (D'ORAZIO *et al.*, 2012), este metabólito vem sendo estudado quanto a outros efeitos biológicos. SHIRATORI *et al.* (2005) reportaram sua atividade anti-inflamatória comparada à prednisolona, um fármaco anti-inflamatório esteroidal. Estudos têm demonstrado sua atividade anticancerígena, bem como de seu metabólito o fucoxantíno, superior ao betacaroteno e à astaxantina, sugerindo que algas marinhas têm grande potencial no desenvolvimento de produtos voltados à prevenção e tratamento de diversos tipos de neoplasias, e.g., câncer de próstata, leucemia e câncer de cólon (PANGESTUTI *et al.*, 2011; D'ORAZIO *et al.*, 2012). Como resultante deste cenário de informações, alguns produtos nutracêuticos contendo fucoxantina já são largamente comercializados no mercado mundial, e.g., suplementos para controle do ganho de peso e termogênicos.

As atividades, anti-inflamatória (SHIRATORI *et al.* 2005), antidiabética e de controle da obesidade (MAEDA *et al.* 2007) da fucoxantina já foram testadas *in vivo*. No entanto, a absorção de fucoxantina no organismo humano é fortemente dependente de diversos fatores que não estão completamente elucidados, como o tipo de dieta e a estabilidade do composto (PANGESTUTI *et al.*, 2011). De fato, estes autores sugerem que a absorção de fucoxantina no organismo pode ser dependente de uma dieta lipídica, em conexão com um processo de esterificação daquele metabólito em produtos altamente apolares em células do intestino humano e em ratos (SUGAWARA *et al.*, 2009). Neste contexto, MAEDA *et al.* (2007) demonstraram que a

administração de fucoxantina na dieta é mais eficiente no controle do ganho de peso do tecido adiposo branco em ratos quando associada com óleo de peixe.

### 1.3. Diatomáceas

As espécies de algas têm grande importância ambiental como elementos base da cadeia trófica. Economicamente, apresentam aplicações comerciais nas áreas da nutrição, da saúde, do tratamento de águas residuais, da produção de energia e da química fina. Comparativamente aos organismos terrestres, o estudo de produtos naturais marinhos é relativamente recente e isto se deve, entre outras causas, ao desenvolvimento de técnicas espectroscópicas que permitem a elucidação estrutural de moléculas complexas (SIMÕES *et al.*, 2010).

Os compostos majoritários encontrados em extratos de algas são polissacarídeos, compostos fenólicos, florotaninos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, lipídios, terpenoides e esteroides, vitaminas e minerais (CHOJNACKA *et al.*, 2015). Dos pigmentos encontrados em microalgas, os carotenoides têm sido os mais explorados comercialmente, comparativamente às outras duas classes de pigmentos encontrados em algas: as clorofilas e as ficobilinas (LOURENÇO, 2006).

As espécies utilizadas neste trabalho, i.e, *Phaedactylum tricorutum*, *Chaetoceros mulleri*, *Chaetoceros calcitrans* e *Thalassiosira fluviatilis* estão compreendidas em um grupo de microalgas conhecidas como diatomáceas. A principal característica morfológica que distingue as diatomáceas, das quais se conhece em torno de 12 mil espécies, diz respeito às suas frústulas silicosas, que são estruturas bivalves complexas que se encaixam formando uma espécie de teca protegendo a célula e que divide as diatomáceas em dois grandes grupos, i. e., cêntricas, com frústulas de simetria radial e penadas, com frústulas de simetria bilateral (LOURENÇO, 2006). Usualmente, apresentam a crisolaminarina e gotículas de óleo como produtos de reserva e suas células variam de 2 µm a 2 mm de diâmetro; seus plastos apresentam clorofilas *a* e *c*, betacaroteno, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina como seus principais pigmentos fotossintéticos. As diatomáceas cêntricas possuem plastos geralmente pequenos, discóides e numerosos, enquanto as diatomáceas penadas possuem dois grandes plastos achatados (LOURENÇO, 2006).

Os pigmentos desempenham importante papel na fotossíntese de algas. Como exposto anteriormente, o ciclo das xantofilas tem papel

importante na fotoproteção de tecidos verdes. Em diatomáceas e dinoflagelados, o ciclo das xantofilas consiste no pigmento diadinoxantina, o qual é transformado via de-epoxidação em diatoxantina (diatomáceas) ou dinoxantina (dinoflagelados), em excesso de luz (JEFFREY *et al.*, 1997). Quando as condições de estresse cessam, a diatoxantina/dinoxantina é novamente epoxidada e a diadinoxantina é restaurada (RMIKI *et al.*, 1999).

A produção em larga escala de microalgas teve início nos anos sessenta, no Japão, com o cultivo de *Chlorella* como aditivo alimentar. Em 2004, a indústria já produzia 7 mil toneladas de matéria seca daquela espécie, anualmente. O consumo humano de microalgas é restrito a poucas espécies, onde *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* dominam o mercado (BRENNAN *et al.*, 2010).

### *Algas, biocombustíveis e pigmentos*

Microalgas, entre as quais as diatomáceas, têm sido também organismos de estudos à produção de biocombustíveis. Isto, devido a sua alta capacidade de síntese e acúmulo de lipídios. Porém, outros compostos de maior valor agregado podem ser obtidos destes organismos em simultâneo. Entre eles, os carotenoides destacam-se em função de seus conteúdos e, eventualmente, valor agregado, e que neste estudo, são os compostos de principal interesse, em especial na fucoxantina.

A produção de biocombustíveis, cuja primeira geração se baseia em biomassas de grãos de espécies oleaginosas, tem recebido atenção e incentivos crescentes nos últimos anos devido às políticas relacionadas com as emissões de CO<sub>2</sub>. No entanto, mais recentemente, tem sido dada atenção ao potencial de produção de biocombustíveis a partir de algas, por diversos fatores, e.g., maior produtividade em relação às espécies terrestres, alto potencial de crescimento, não comprometimento da produção de alimentos e mitigação das emissões de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) BRENNAN *et al.* (2010). Estes mesmos autores sugerem que a produção de biocombustíveis aliada à co-produtos de alto valor agregado, entre eles os carotenoides, tem grande potencial, uma vez que a produção em larga escala de biomassa algal para biocombustíveis automaticamente incrementa a disponibilidade de co-produtos e as tecnologias desenvolvidas ao cultivo, extração e processamento da biomassa, as quais podem ser adaptadas e aproveitadas à otimização da recuperação dos co-produtos de interesse.

Sob condições de estresse, algas podem acumular carotenoides de importância econômica. Quando uma célula ou organismo tem combustível metabólico suficiente para suprir suas necessidades energéticas, geralmente o excesso é convertido em ácido graxo e estocado como lipídios, como os triacilgliceróis (NELSON *et al.*, 2013). No entanto, sob condições de estresse, como alterações de luz, pH, salinidade, temperatura e nutrientes, este excesso pode não ser armazenado para dar origem a outros compostos, como os carotenoides.

Sob condições desfavoráveis, algas sintetizam e acumulam diversos carotenoides secundários. Carotenoides secundários são aqueles carotenoides que geralmente se acumulam fora das membranas dos tilacóides, comumente produzidos sob condições de estresse. De interesse, ressalta-se que a regulação da biossíntese desses difere da contraparte associada ao aparato fotossintético (RMIKI *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.* 2003). Atualmente, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis* são as microalgas mais estudadas à obtenção dos carotenoides secundários, betacaroteno e astaxantina, respectivamente.

*Phaeodactylum tricornutum* é uma diatomácea penada com a propriedade não usual de ser pleomórfica, a qual se relaciona com a natureza atípica da parede celular que é fracamente silificada, quando comparada a outras diatomáceas (DE MARTINO *et al.*, 2007). Esta espécie é uma das duas diatomáceas com genoma sequenciado, servindo como modelo de investigação e como potencial fonte comercial de fucoxantina (KIM *et al.*, 2012). Apresenta altas concentrações de lipídios e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, sendo cultivada para uso na alimentação de animais marinhos de interesse comercial em aquicultura (LOURENÇO, 2006). De acordo com LAKMAL *et al.* (2015), a microalga *P. tricornutum* apresenta em sua composição 34,7% em proteínas, 15,7% em carboidratos e 2,5% em lipídios.

*Thalassiosira fluviatilis*, assim como *P. tricornutum*, é cultivada para uso na alimentação de animais marinhos de interesse comercial devido à facilidade de cultivo e presença de altas concentrações de lipídios e ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa em sua composição (LOURENÇO, 2006).

*Chaetoceros muelleri* é bem conhecida por ser utilizada na alimentação de larvas de camarão, mas também é estudada devido a sua atividade antimicrobiana, que por sua vez está relacionada com sua composição de ácidos graxos, principalmente triglicerídeos, lipídeos polares e ácidos graxos livres (MENDIOLA *et al.*, 2007), além de ser



facilmente cultivada em grande escala em lugares fechados ou abertos (WANG *et al.*, 2014).

*Chaetoceros calcitrans* está entre as espécies cultivadas à produção de ácidos graxos ômega (RUBIO *et al.*, 2015), sendo uma das espécies mais frequentemente utilizadas na maricultura comercial (ASHOKKUMAR *et al.*, 2015).

#### 1.4. Óleos vegetais e extração de carotenóides de microalgas

Óleos vegetais são obtidos geralmente de sementes oleaginosas, sendo um dos principais componentes da dieta humana. A biomassa vegetal é prensada à extração do óleo e/ou é extraída com auxílio de solventes orgânicos que, após a extração, são removidos por destilação (SUN *et al.*, 2012).

Os óleos vegetais são usualmente misturas quimicamente complexas de compostos derivados de uma molécula de glicerol que esterifica três longas cadeias de ácidos graxos saturados e/ou insaturados. Lipídios de microalgas, por sua vez, são quimicamente similares aos encontrados em óleos vegetais, sendo que as microalgas são compostas principalmente de quatro ácidos graxos insaturados, i.e., palmitoleico (16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3), apresentando também, em menores proporções, ácidos graxos saturados como palmítico (16:0) e esteárico (18:0) (CONTRERAS *et al.*, 2015).

Solventes orgânicos têm sido, em sua maioria, os veículos de extração utilizados à obtenção de carotenoides devido a sua polaridade e consequente afinidade com estes últimos. No entanto, solventes orgânicos são tóxicos em sua maioria e precisam ser removidos ao final do processo (JOHNSON *et al.*, 1983). Por outro lado, óleos vegetais são parte importante da dieta humana e animal, sendo também componentes imprescindíveis em alguns produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos. Carotenoides, por sua vez, além de serem solúveis em óleos vegetais, parecem ter sua biodisponibilidade aumentada quando dissolvidos nestes últimos (PANGESTUTI *et al.*, 2011).

Óleos vegetais têm sido utilizados à extração de carotenoides de biomassas provenientes de espécies vegetais e também de microalgas, principalmente aliados às técnicas de extração de fluído supercrítico. KRICHNAVARUK *et al.* (2008) obtiveram valores superiores na extração de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* por extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, utilizando óleo de soja e óleo de oliva como co-solventes, comparativamente à extração sem a adição de co-solventes.

SUN *et al.* (2006) otimizaram significativamente a recuperação de carotenos e luteína de cenouras por extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, utilizando óleo de canola como co-solvente em comparação ao uso de CO<sub>2</sub> somente.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Determinar o perfil de compostos carotenóidicos das microalgas, *Phaeodactylum tricornerutum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase em fucoxantina, utilizando solventes orgânicos e óleos vegetais como veículos de extração.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Adaptar um protocolo de extração e purificação pré-existente à extração, isolamento, identificação e quantificação de carotenoides das espécies de microalgas, *P. tricornerutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis*, com ênfase em fucoxantina, utilizando técnicas de espectrofotometria UV-vis, CCD, CLAE e espectrometria de massa;
- ✓ Determinar a eficiência de óleos vegetais como veículos de extração de carotenoides das espécies em estudo, via análise por espectrofotometria UV-vis dos extratos;
- ✓ Comparar a eficiência de quatro métodos de extração de carotenoides, via análise por espectrofotometria UV-vis dos extratos;
- ✓ Determinar o tempo máximo de estabilidade dos extratos brutos e das frações ricas em fucoxantina, conservados sob três formas, i.e., secos, em MeOH e em óleo, e em três condições térmicas: temperatura ambiente, -20°C e -80°C;
- ✓ Comparar a eficiência do óleo vegetal como veículo de extração àquela do solvente orgânico.

## **3. Material e métodos**

### 3.1. Obtenção e armazenamento da biomassa

As biomassas das espécies *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *P. tricornutum* e *T. fluviatilis* foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) do departamento de aquicultura da UFSC, sob responsabilidade do professor Roberto Bianchini Derner e Rafael Garcia Lopes. As microalgas foram cultivadas em meio de cultura *f/2* (GUILLARD, 1975), suplementado com silicato e, após 30 dias, recuperadas através de centrifugação (20 min, 3500 rpm), liofilizadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o transporte ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), sob refrigeração ( $0^{\circ}\text{C}$ ) e protegidos da luz. As biomassas algais permaneceram armazenadas à  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise.

### 3.2. Extração dos carotenoides utilizando solvente orgânico

Amostras (0,1g) das biomassas liofilizadas das espécies *C. calcitrans*, *C. muelleri*, *P. tricornutum* e *T. fluviatilis* foram maceradas em nitrogênio líquido e MeOH. Um protocolo de extração exaustiva foi adotado, como descrito a seguir.

Numa primeira extração, 0,1g de amostra macerada foi adicionada de 50 mL de MeOH, sob agitação com auxílio de uma barra magnética, por 1 h. Em seguida, o sistema foi centrifugado (10 min, 4000 rpm), o sobrenadante recuperado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A mesma biomassa foi novamente acrescida de 50 mL de MeOH, repetindo-se o processo acima descrito por 3 vezes, porém, com tempo de extração ampliado para 24 h, i.e., 6 h sob agitação e 18 h em repouso. Os extratos metanólicos foram filtrados em suporte de celulose, sob vácuo, e ao final deste processo aproximadamente 200 mL de extrato para cada microalga foram recuperados e analisados por espectrofotometria UV-vis para quantificação de carotenoides totais. Estes extratos foram utilizados à obtenção de fucoxantina purificada, posteriormente.

Apesar da boa solubilidade dos carotenoides em solventes orgânicos de maior apolaridade de uma forma geral (e.g., *n*-hexano), as xantofilas, como a fucoxantina, apresentam maior solubilidade em solventes menos apolares como o MeOH e etanol. Isto se deve a presença de oxigênio em suas moléculas, uma característica estrutural que lhes confere menor apolaridade que os carotenos. Por este motivo, o MeOH foi utilizado como solvente de extração neste estudo.

### 3.3. Espectrofotometria de varredura UV-Visível

Os extratos obtidos foram submetidos à análise espectrofotométrica de varredura UV-vis ( $\lambda=200-700\text{nm}$ ) (Gold Spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer), para determinação do perfil espectroscópico, com ênfase na região de absorção de carotenoides  $\lambda=400-500\text{nm}$ ).

### 3.4. Quantificação de carotenoides totais

Para efeitos de cálculo da concentração de pigmentos carotenóidicos nos extratos metanólicos via espectrofotometria ( $\lambda=450\text{nm}$ ), utilizou-se uma curva-padrão de fucoxantina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 1 - 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $y = 0,051301x$ ;  $r^2=0,99$ ) em MeOH.

Para efeitos de cálculo da concentração de pigmentos carotenóidicos nos extratos em óleo via espectrofotometria ( $\lambda=450\text{nm}$ ), uma curva padrão de fucoxantina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 5 - 65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $y = 0,0344x$ ;  $r^2=0,98$ ) foi construída em óleo de canola.

### 3.5. Purificação dos extratos em organossolvente

Os extratos metanólicos obtidos foram submetidos a uma etapa prévia de purificação para separação da fase mais apolar. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (55°C, 45rpm), ressuspensos em 30 mL de MeOH, transferidos para funil de separação e adicionados de 90 mL (3 volumes) de acetato de etila: água (1: 1, v/v), formando um sistema bifásico. A fase superior (acetato de etila) de cada extrato foi recuperada.

Previamente às análises cromatográficas, os extratos foram novamente concentrados em rotaevaporador (55°C, 45rpm), seguido da adição de volume mínimo de acetato de etila (10 mL) à completa ressolubilização dos compostos. O volume amostral foi reduzido a 1mL, sob fluxo de nitrogênio gasoso, para subsequente análise por cromatografia em coluna aberta de sílica gel. Este mesmo processo foi utilizado à purificação dos extratos à análise por cromatografia em camada delgada (CCD).

### 3.6. Cromatografia em camada delgada

Como uma primeira etapa, rápida e de custo relativamente baixo, para determinação da presença de fucoxantina nos extratos, utilizou-se a técnica de CCD. Alíquotas (0,1g) de biomassa de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis*, previamente maceradas em nitrogênio líquido foram submetidas à extração com MeOH (50mL), sob agitação (1h). Os extratos foram centrifugados (10 min, 4000 rpm), os sobrenadantes recuperados e submetidos a uma pré-purificação (ver item 4.5).

Os extratos recuperados desta etapa foram analisados por CCD unidimensional. As separações cromatográficas utilizaram suporte de sílica gel (Whatman®) (9,0 cm x 7,0 cm). Uma alíquota de 10 µL de cada extrato em acetato de etila foram aplicados na placa, previamente ativada em estufa (1h, 120°C), seguido de eluição em fase móvel de hexano: acetona (6: 4, v/v). Adicionalmente, 10 µL dos padrões de betacaroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA - 500 µg mL<sup>-1</sup>) e de fucoxantina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA - 500 µg mL<sup>-1</sup>) foram aplicados. Após a eluição, a fase móvel foi removida sob fluxo de ar quente em capela de exaustão e os cromatogramas registrados fotograficamente com câmera digital Canon PowerShot ELPH 300 HS, 12.1 MP.

### 3.7. Cromatografia líquida em coluna aberta de sílica gel

Para a obtenção da fração rica em fucoxantina por cromatografia, seguiu-se o protocolo de TAKAHASHI *et al.* (2009), com algumas modificações. Os extratos (1mL) obtidos após a etapa de pré-purificação (ver item 4.5) foram submetidos à cromatografia em coluna de sílica gel (25 cm<sup>3</sup>), previamente equilibrada com 3 volumes de *n*-hexano. Os extratos foram eluídos com solução de clorofórmio: MeOH: H<sub>2</sub>O (65: 25: 4, v/v/v), recuperando-se a fração de cor alaranjado-vermelho. Sequencialmente, uma segunda separação cromatográfica da fração de interesse foi realizada sobre a mesma fase estacionária, porém com eluição com solução de *n*-hexano: acetona (6: 4, v/v), recuperando-se novamente a fração de tonalidade alaranjada-vermelho.

### 3.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação de fucoxantina pela técnica de CLAE foi aplicada às amostras de extrato bruto e às frações ricas em fucoxantina dos respectivos extratos brutos das quatro microalgas (ver item 3.5). Os extratos brutos foram previamente purificados (ver item 3.5) e uma alíquota (0,5mL – em acetato de etila) foi seca em rotaevaporador (55°C, 45 rpm) e ressolubilizada em MeOH (0,5 mL), previamente à injeção no cromatógrafo.

Alíquotas (10 µL) de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Vydac 201TP54, 250 mm x 4,6 mm Ø interno, 5 µm), pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 µm) e detector espectrofotométrico UV-Vis operando em 450 nm. A eluição utilizou MeOH: acetonitrila (90: 10, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A identificação dos compostos de interesse foi realizada via comparação com os tempos de retenção do composto padrão (fucoxantina, Sigma-Aldrich), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenoides utilizou curva padrão externa de fucoxantina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 1 a 50 µg.mL<sup>-1</sup> -  $y = 29979x$ ,  $r^2 = 0,99$ ) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração. Os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções sequenciais/amostra e a concentração média de carotenoides foi expressa em mg/g de biomassa seca.

### 3.9. Espectrometria de massa

A confirmação da identidade da fucoxantina foi feita por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS, em espectrômetro de massa micrOTOF-QII (Bruker Daltonics), equipado com fonte APPI (do Atmospheric Pressure Photoionization), operando em modo positivo, e analisador com triplo quadrupolo. Uma amplitude espectral de  $m/z$  50 a 3000 foi considerada à aquisição dos dados. O processamento e a análise dos dados utilizou o *software* Bruker Compass DataAnalysis 4.0.

### 3.10. Extração de carotenóides com óleos vegetais

Óleos vegetais foram testados como solventes à extração de carotenóides das microalgas *P. tricornutum*, *T. fluviatilis* e *C. muelleri*, a saber: óleo de girassol, óleo de milho, óleo de soja, óleo de canola, óleo de arroz, óleo de gergelim, óleo de café verde, óleo de uva e óleo de algodão.

Amostras maceradas de biomassas liofilizadas (0,1g) foram adicionadas de 20 mL de óleo, transferidas a agitador magnético termostaticado (1h, banho-maria, 28°C) e centrifugadas (10 min, 4000 rpm). Os sobrenadantes foram recuperados e submetidos à análise espectrofotométrica de varredura UV-vis à determinação do teor de carotenóides totais (vide itens 4.3 e 4.4). As extrações e análises foram realizadas em triplicata para cada óleo vegetal.

### 3.11. Otimização da extração de carotenóides com óleos vegetais

Um protocolo otimizado à extração de carotenóides com óleos vegetais foi implementado. Para tal, foi escolhido o óleo vegetal que apresentou maior valor de absorbância na extração dos pigmentos à espécie de maior potencial definida previamente neste estudo, i.e. óleo de canola e a microalga *P. tricornutum*. Os protocolos inicialmente consideraram, ao longo de um período experimental de 24h, a extração à temperatura ambiente (28°C - controle de referência) e metodologias de extração assistida por microondas e ultrassom.

#### 3.11.1. Extração à 28°C com intervalos de tempos amostrais

As amostras liofilizadas (0,1g) de *P. tricornutum*, foram adicionadas de 20 mL de óleo de canola e mantidas em agitador magnético por 0h - *controle*, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 12h e 24h, em banho-maria (28°C) e centrifugadas (10 min, 4000 rpm). Os sobrenadantes foram recuperados, seguindo-se a quantificação de carotenóides totais por espectrofotometria UV-vis (ver item 3.4). As extrações e análises foram realizadas em triplicata.

### **3.11.2. Extração assistida por micro-ondas**

Amostras liofilizadas (0,1g) de *P. tricornutum*, foram adicionadas de 20 mL de óleo de canola, homogeneizadas brevemente com o auxílio de barra magnética e submetidas à radiação em forno de micro-ondas (Panasonic Family NN-ST669, 2,5 GHz) por 10s, 30s e 50s. Os extratos foram centrifugados (10 min, 4000 rpm) e os sobrenadantes analisados quanto ao conteúdo total de carotenoides (vide item 4.4). As extrações e análises foram realizadas em triplicata.

### **3.11.3. Extração assistida por ultrassom**

As amostras liofilizadas (0,1g) de *P. tricornutum* foram adicionadas de 20 mL de óleo de canola, homogeneizadas brevemente com o auxílio de barra magnética e submetidas a ultrassom (40 kHz, 1h). Os extratos foram centrifugados (10 min, 4000 rpm) e os sobrenadantes recuperados à determinação da concentração de compostos carotenoidicos totais (vide item 4.4). As extrações e análises foram realizadas em triplicata.

## **3.12. Análise comparativa dos rendimentos de extração em solvente orgânico e em óleos vegetais**

Para estabelecer uma relação comparativa do potencial de extração de óleos vegetais e do metanol, um experimento de *time-course* foi conduzido ao longo de 24h, utilizando-se amostras de biomassas de *P. tricornutum*.

Amostras liofilizadas (0,1g) de *P. tricornutum* foram adicionadas de 50 mL do veículo de extração (MeOH ou óleo de canola), transferidas a agitador magnético por 1h, 6h, 12h e 24h, em temperatura ambiente e centrifugadas (10 min, 4000 rpm) à recuperação dos sobrenadantes. A eficiência dos veículos de extração foi determinada ao longo dos períodos amostrais, a partir da quantificação de carotenoides totais (vide item 4.4). As análises foram realizadas em triplicata.

### **3.13. Estabilidade dos compostos carotenoidicos**



Numa terceira abordagem experimental, a estabilidade dos compostos carotenóidicos nos extratos brutos e frações ricas em fucoxantina de *P. tricornutum* foi determinada. Para tal, alíquotas secas, em MeOH e em óleo de canola de extratos/frações enriquecidas, armazenadas à temperatura ambiente, -20°C e -80°C e protegidas da luz foram submetidas à análise espectrofotométrica de varredura UV-vis (vide item 4.3) em três momentos amostrais para verificar possíveis alterações no perfil espectroscópico.

### **3.14. Análises estatísticas**

Os dados foram compilados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA) com auxílio do software *Assistat 7.7* (SILVA, 2015) para verificar o efeito dos tratamentos sobre os conteúdos de carotenoides totais e fucoxantina nos extratos analisados. O teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foi aplicado para testar as diferenças entre médias das variáveis em estudo, quando oportuno.

## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Quantificação de pigmentos carotenoidicos nos extratos organossolventes por espectrofotometria UV-vis**

Dada a diversidade química dos carotenoides, a determinação de seus conteúdos totais por espectrofotometria é de certa maneira imprecisa, por ser pouco seletiva quando comparada a de outros pigmentos como, por exemplo, as clorofilas. Todavia, esta abordagem se mostra válida para uma estimativa rápida dos conteúdos totais presentes em amostras (LOURENÇO, 2006).

No presente estudo, a determinação da concentração de pigmentos totais em extratos brutos organossolventes via espectrofotometria UV-vis ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) utilizou curva-padrão de fucoxantina e revelou valores médios de carotenoides totais bastante superiores no extrato metanólico de *P. tricornutum*, em relação aos extratos metanólicos das demais espécies (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Concentrações de carotenoides totais (mg/g matéria seca, n=3) de extratos metanólicos de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis* determinadas por espectrofotometria UV-visível ( $\lambda = 450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Extratos metanólicos	Carotenoides totais (mg/g matéria seca)
<i>P. tricornutum</i>	104,21 $\pm$ 3,44 <sup>a</sup>
<i>C. muelleri</i>	36,94 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
<i>C. calcitrans</i>	32,48 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>
<i>T. fluviatilis</i>	25,39 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>

Estes resultados apontam *P. tricornutum* como a espécie fonte de fucoxantina preferencial em relação as demais, devido ao fato de ser este o carotenoide majoritário encontrado em diatomáceas. De fato, os teores de carotenoides totais em *P. tricornutum* se mostraram 4,1 vezes superiores comparativamente a *T. fluviatilis*, a microalga de menor conteúdo carotenóidico.

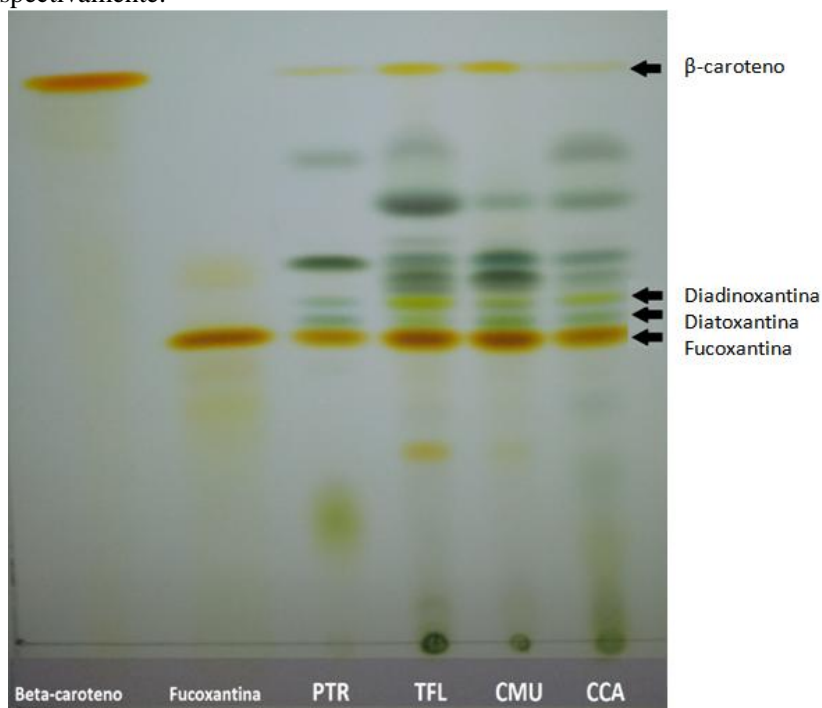
#### 4.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos metanólicos de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis* foram submetidos à CCD para comprovar a presença de fucoxantina (ver item 4.6).

Como integrantes da classe Bacillariophyceae, as diatomáceas possuem em seus plastos clorofilas *a* e *c*, betacaroteno, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina como pigmentos fotossintéticos (LOURENÇO, 2006). Em fase estacionária normal como a sílica gel, os carotenos, devido a seu caráter ligeiramente mais apolar que as xantofilas, eluem primeiramente. Analisando o cromatograma em camada delgada, pode-se constatar claramente a presença de fucoxantina ( $R_f = 0,57$ ) e betacaroteno ( $R_f = 0,99$ ) nas amostras de microalgas (**Figura 2**). O mesmo perfil cromatográfico (**Figura 2**) apresenta duas bandas de cor amarelada logo acima da banda de fucoxantina para as espécies *T. fluviatilis*, *C. muelleri* e *C. calcitrans*. Em função de relatos prévios da composição carotenóidica destas microalgas, tais bandas

foram tentativamente identificadas como diatouxantina e diadinoxantina. Para a espécie *P. tricornutum*, duas bandas de cor esverdeada com valores de Rfs de 0,59 e 0,62 foram detectadas. Neste caso, especula-se que a diatouxantina e diadinoxantina co-eluíram com outro pigmento, ou ainda que estes pigmentos possam ter se degradado.

**Figura 2.** Cromatograma em camada delgada dos extratos metanólicos de *P. tricornutum* (PTR), *T. fluviatilis* (TFL), *C. muelleri* (CMU) e *C. calcitrans* (CCA), previamente solubilizados em acetato de etila, e eluídos em fase móvel de hexano:acetona(6:4, v/v). Os padrões de betacaroteno e fucoxantina são mostrados com valores de Rfs de 0,99 e 0,57, respectivamente.

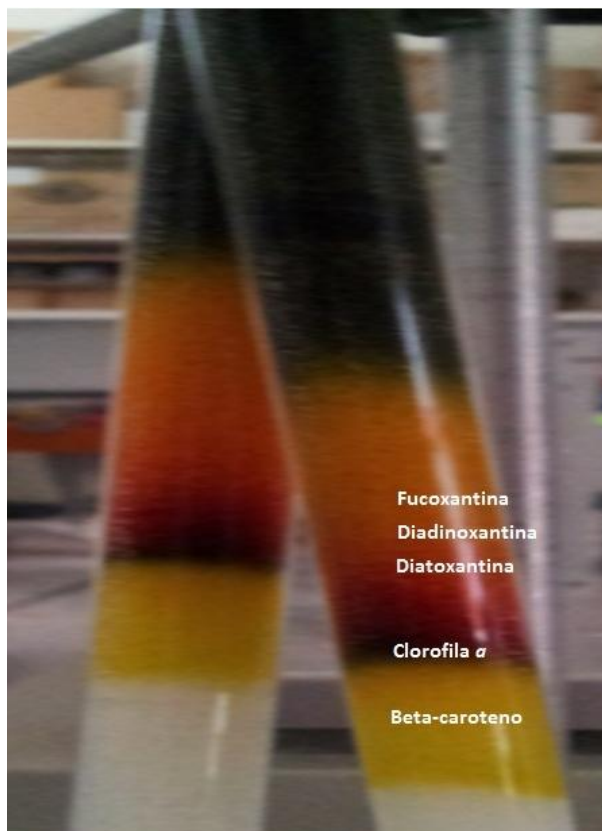


### 4.3. Cromatografia líquida em coluna aberta de sílica

A **Figura 3** ilustra o perfil de eluição cromatográfica ao isolamento e purificação da fração rica em fucoxantina, a partir do extrato metanólico da microalga *P. triornutum*. Este processo foi igualmente realizado para os extratos das demais espécies de microalgas, tendo sido observados perfis similares.

Como mencionado anteriormente para CCD, em fase estacionária normal como a sílica gel, os carotenos, devido a seu caráter ligeiramente mais apolar do que as xantofilas, eluem primeiramente. Como o betacaroteno é o carotenóide mais apolar identificado em diatomáceas, analisando o perfil cromatográfico em coluna aberta (**Figura 3**), supõe-se que a primeira fração de cor amarela é rica em betacaroteno, seguida de uma estreita fração rica em clorofila *a* e uma fração de cor laranja que contém os carotenoides diatoxantina, diadinoxantina e fucoxantina. Posteriormente, a presença de fucoxantina foi comprovada por CLAE, utilizando-se um detector espectrofotométrico UV-Vis.

**Figura 3.** Cromatografia em coluna aberta em sílica gel da fração rica em fucoxantina do extrato de *P. tricornutum*, revelando a presença e a separação de carotenoides nas frações amarela e laranja e de clorofila *a* na fração de cor esverdeada. Eluição realizada em fase móvel de hexano: acetona (6: 4, v/v).



#### 4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos brutos

Os extratos metanólicos de *P. tricornutum*, *C. calcitrans*, *C. muelleri* e *T. fluviatilis* foram submetidos à CLAE. Os cromatogramas

revelaram a presença de fucoxantina às quatro espécies de microalgas analisadas, com um tempo de retenção de 3,7 min, sendo este o carotenoide majoritário. No entanto, as espécies diferiram em seus perfis cromatográficos, não apresentando o mesmo número de compostos. A microalga *T. fluviatilis* apresentou oito compostos, enquanto *P. tricornutum*, *C. calcitrans* e *C. muelleri* apresentaram quatro compostos.

No extrato metanólico de *P. tricornutum*, DAMBEK *et al.* (2012) identificaram, seguindo uma ordem crescente de tempos de retenção, fucoxantina e seu isômero *cis*, seguidos de neoxantina, violaxantina, diadinoxantina e zeaxantina, utilizando uma coluna de fase reversa (C18 nucleosil) e fase móvel acetonitrila: MeOH: 2-propanol (85: 10: 5, v/v/v). Assim, em fase estacionária normal, o pigmento diadinoxantina elui previamente à fucoxantina, enquanto em fase estacionária reversa ocorre o contrário.

Verificou-se via CLAE que a proporção de fucoxantina em relação aos carotenoides totais de cada espécie nos extratos brutos (**Tabela 2**), revelou uma amplitude de valores de 51% (*P. tricornutum*) a 90% (*C. muelleri*). O maior conteúdo daquele pigmento foi detectado no extrato de *P. tricornutum*, seguido dos extratos de *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis*.

**Tabela 2:** Quantificação de fucoxantina (mg/g biomassa seca, n=3) de extratos metanólicos brutos de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis* determinadas por CLAE-UV-Vis. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Extratos metanólicos brutos	Concentração de fucoxantina (mg/g matéria seca)	Concentração relativa (%) no extrato
<i>P. tricornutum</i>	38,04 ± 1,40 <sup>a</sup>	51 %
<i>C. muelleri</i>	27,44 ± 0,60 <sup>b</sup>	90%
<i>C. calcitrans</i>	15,94 ± 0,13 <sup>c</sup>	66 %
<i>T. fluviatilis</i>	12,70 ± 0,15 <sup>d</sup>	59 %

EILERS *et al.* (2015), reporta valores em diferentes cepas de *P. tricornutum* modificadas geneticamente entre 7,8 a 24,2 mg fucoxantina g<sup>-1</sup> ms, em contraposição ao encontrado em uma cepa selvagem (10,3 mg fucoxantina g<sup>-1</sup> ms). Além disso, teores de 0,7 a 3,05 mg g<sup>-1</sup> ms de diadinoxantina foram detectados nas cepas modificadas geneticamente, superiores ao observado na cepa selvagem (0,7 mg g<sup>-1</sup> ms). Similarmente, uma cepa transgênica apresentou maior conteúdo de betacaroteno (0,2 a 1,0 mg g<sup>-1</sup> ms) em relação à cepa selvagem - 0,3 mg g<sup>-1</sup> ms (EILERS *et al.*, 2015). O potencial da microalga *P. tricornutum* como fonte de fucoxantina já havia sido reportado por KIM (2012), que encontrou 16,33 mg g<sup>-1</sup> ms daquele pigmento em extrato etanólico .

FOO *et al.* (2015) reportaram que o conteúdo de fucoxantina nos extratos metanólicos e etanólicos (2,08 e 2,32 mg/g biomassa seca, respectivamente) da microalga *C. calcitrans* corresponderam a 47% e 57% do conteúdo de carotenoides totais. No presente trabalho, os extratos brutos em MeOH de *C. calcitrans* foram bastante superiores. i.e., 15,94 mg fucoxantina/g biomassa seca (**Tabela 2**), correspondendo a 66% do conteúdo de carotenoides totais (32,48mg/g mat. seca - **Tabela 1**).

De interesse, ressalta-se que não foram encontrados trabalhos que quantificam carotenoides nas espécies *C. muelleri* e *T. fluviatilis*.

Diversos fatores, e.g., a cepa e os sistemas de cultivo, podem contribuir às diferenças de valores de concentração observadas nos estudos citados em relação aos dados aqui apresentados. Além disso, o volume de solvente em relação à massa amostral, o número de extrações, o tempo de extração, o tempo de agitação, e os métodos de homogeneização da biomassa (e.g., ultraturrax, maceração em nitrogênio líquido e sonicação) são variáveis que interferem nos valores de rendimento de extração.

A espécie *C. muelleri* revelou-se uma fonte interessante de fucoxantina, apesar da quantidade inferior observada em relação à *P. tricornutum*. Devido ao grau de pureza relevante de fucoxantina no extrato bruto de *C. muelleri*, i.e., 90%, em contraposição a 51% de *P. tricornutum*, assume-se que sua purificação subsequente a partir da respectiva fração enriquecida de *C. muelleri* apresente menor dificuldade.

É interessante ressaltar que mesmo o menor valor de concentração de fucoxantina detectado, 12,70 mg/g biomassa seca para *T. fluviatilis*, ainda mostra-se substancialmente superior aos valores reportados para espécies de macroalgas. Como exemplo, KANDA *et al.* (2014) detectaram 0,39 mg fucoxantina g<sup>-1</sup> ms em *Undaria*

*pinnatifida*, enquanto LANN et al. (2012) observaram teores ainda menores para diversas espécies de *Sargassum* sp. (0,014 a 0,15 mg g<sup>-1</sup> ms) e KIM et al. (2012) obteve 1,3 mg g<sup>-1</sup> ms de fucoxantina da macroalga *Eisenia bicyclis*.

Outro fato importante ao se comparar o potencial das microalgas como fonte de carotenoides é o cultivo destas em relação a extração de biomassa macroalgal em bancos naturais, ou ainda ao cultivo destas utilizando técnicas de aquicultura. A extração de macroalgas de bancos naturais pode se tornar um problema se feito em grande escala, ameaçando a sobrevivência da espécie alvo. Já os cultivos de microalgas, apesar de se encontrarem em sua infância quando comparados aos cultivos de macroalgas, apresentam algumas vantagens como rápido crescimento, maior rendimento por área e maior homogeneidade de sua biomassa. Estes organismos podem ser cultivados em sistemas fechados como fotobiorreatores, facilitando o controle das condições ótimas de cultivo.

#### **4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das frações ricas em fucoxantina**

Alíquotas de 1 ml, 10% de cada um dos extratos metanólicos, previamente à análise por CLAE, foram submetidas a uma etapa de purificação por cromatografia em coluna aberta de sílica. As frações ricas em fucoxantina foram analisadas por CLAE/UV-Vis para determinação do grau de pureza e quantificação do pigmento. Os cromatogramas mostrados na **Figura 4** revelam a existência de um pico majoritário no tempo de retenção de 3,7 min, coincidindo com o tempo de retenção do padrão de fucoxantina utilizado neste trabalho. Um tempo de retenção similar (3,6 min), foi reportado por FUNG et. al. (2013) para fucoxantina em condições cromatográficas semelhantes. De interesse, ressalta-se que o grau de pureza alcançado mostrou-se dependente da espécie em estudo, variando de 96% para *C. calcitrans* até 100% para *C. muelleri* (**Tabela 3**).

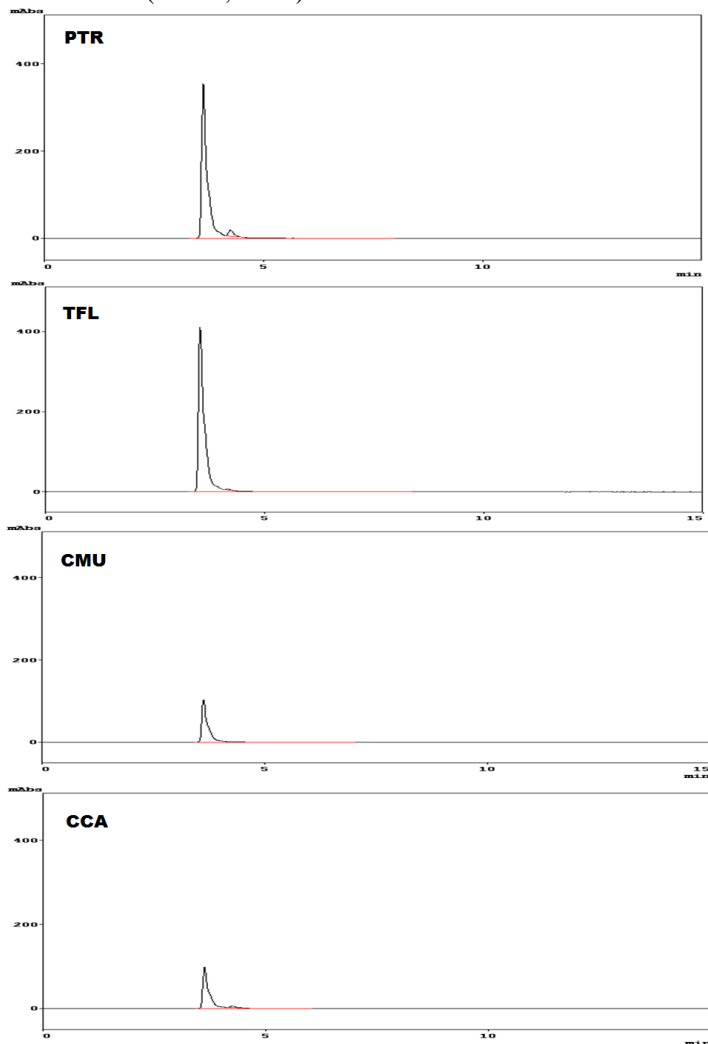


**Tabela 3:** Concentração (mg/g matéria seca) e pureza (%) de fucoxantina (n=3) em frações metanólicas purificadas de *P. tricornutum*, *C. muelleri*, *C. calcitrans* e *T. fluviatilis* determinadas por CLAE. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

Frações purificadas	Fucoxantina (mg/g matéria seca)	Grau de pureza (%, CLAE)
<i>P. tricornutum</i>	34,24 ± 1,44 <sup>a</sup>	97 %
<i>C. muelleri</i>	10,80 ± 0,25 <sup>b</sup>	100%
<i>C. calcitrans</i>	9,76 ± 0,13 <sup>c</sup>	96 %
<i>T. fluviatilis</i>	8,15 ± 0,33 <sup>d</sup>	99 %

Ao compararmos os valores de concentração de fucoxantina nos extratos purificados (**Tabela 3**) em relação aos extratos brutos (**Tabela 2**), nota-se que as quantidades de fucoxantina purificada são inferiores àquelas dos extratos brutos. Isto pode ser explicado pelo fato de que nas etapas cromatográficas a separação das frações, principalmente na coluna aberta de sílica gel, não é completamente perceptível a olho nu, dificultando a recuperação total do carotenoide alvo. Conseqüentemente, uma certa quantidade do pigmento de interesse é perdida. Isto pode ser minimizado procurando-se desprezar o mínimo possível do volume eluído da interface com as demais frações, sem comprometer o grau de pureza. Além disso, alterações nos parâmetros cromatográficos, e.g., dimensões da coluna e proporção das fases móveis poderão otimizar a separação dos analitos e a recuperação da fucoxantina.

**Figura 4:** Perfil cromatográfico (CLAE,  $\lambda = 450$  nm) das frações metanólicas purificadas de *P. tricornutum* (PTR), *T. fluviatilis* (TFL), *C. muelleri* (CMU) e *C. calcitrans* (CCA), evidenciando o pico de fucoxantina (Rt = 3,7 min).



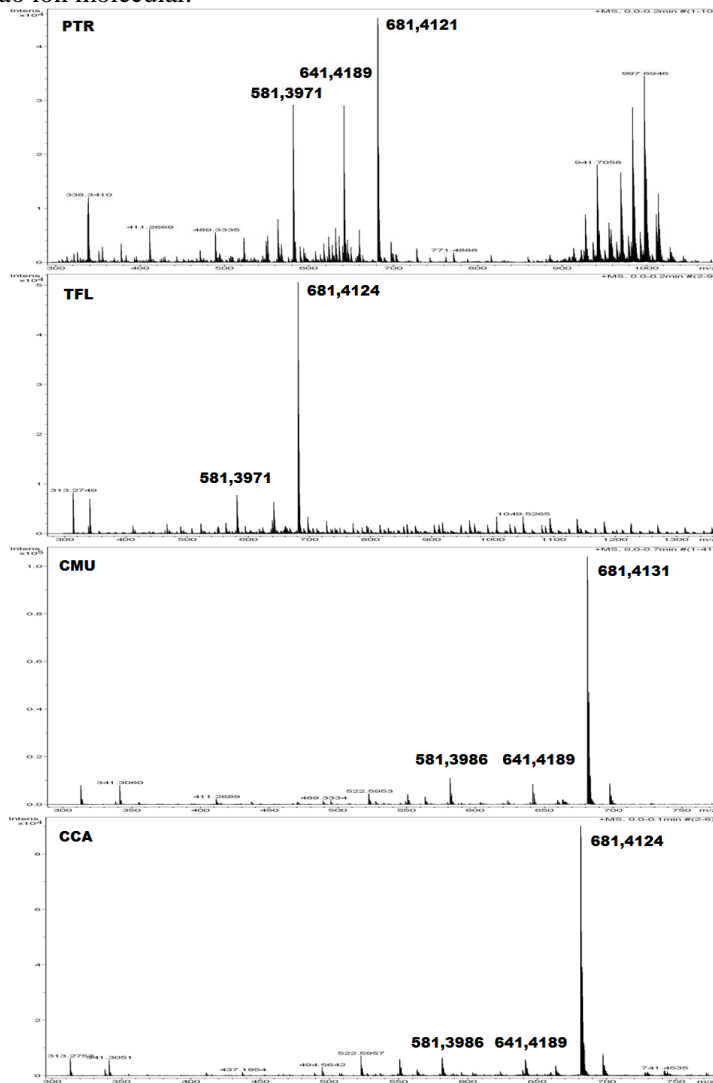
#### 4.6. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que permite que substâncias químicas possam ser detectadas em suas formas ionizadas, de acordo com suas razões massa-carga ( $m/z$ ), de modo que cada composto possa ser identificado por seu íon molecular e/ou seus fragmentos moleculares (HOFFMANN et. al., 2007).

A fucoxantina tem peso molecular de 658,90632 g/mol (PUBCHEM, 2015). Nos espectros de massa das frações purificadas das espécies *P. tricorutum*, *C. calcitrans*, *C. muelleri* e *T. fluviatilis*, valores de  $m/z$  581,40  $m/z$  e 681,41  $m/z$  para as quatro espécies e 641,42  $m/z$  para *C. calcitrans*, *P. tricorutum* e *C. muelleri* (**Figura 5**) foram identificados. Propõe-se que os valores de fragmentação 581,40  $m/z$ , 681,41  $m/z$  e 641,42  $m/z$  correspondam, respectivamente, aos íons  $[M+H-H_2O-AcOH]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+H-H_2O]^+$ , em que  $[M]^+$  se refere ao íon molecular. Resultados semelhantes foram encontrados por KIM et.al (2012), YI et al. (2015), ZHANG et al. (2015), CRUPI et al. (2013) e ZAILANIE et al. (2014).

Desta forma, considerando o fato já conhecido de que a fucoxantina representa o carotenoide majoritário em diatomáceas, os resultados das análises de CLAE-UV-Vis e CLAE-EM confirmam a identidade da fucoxantina como composto majoritário nas amostras das quatro espécies de microalgas em estudo.

**Figura 5.** Espectros de massa (modo positivo, 50-3000  $m/z$ ) das frações metanólicas purificadas de *P. tricornutum* (PTR), *T. fluviatilis* (TFL), *C. muelleri* (CMU) e *C. calcitrans* (CCA). Valores de fragmentação 581,40  $m/z$ , 681,41  $m/z$  e 641,42  $m/z$  correspondendo, respectivamente, aos íons  $[M+H-H_2O-AcOH]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+H-H_2O]^+$ , em que  $[M]^+$  se refere ao íon molecular.



#### 4.7. Extração de carotenoides com óleos vegetais

Três espécies de diatomáceas (*P. tricornutum*, *T. fluviatilis* e *C. muelleri*) foram escolhidas para testar óleos vegetais como solventes à extração de carotenoides, a saber: óleo de girassol, óleo de milho, óleo de soja, óleo de canola, óleo de arroz, óleo de gergelim, óleo de café verde, óleo de uva e óleo de algodão.

Em um primeiro momento, o objetivo de se utilizar três espécies no experimento foi o de verificar se a quantidade de carotenoides extraída pelos óleos vegetais seria proporcionalmente equivalente entre as espécies, ou seja, se o potencial de extração do óleo seria independente da espécie escolhida.

Os resultados (**Tabela 4**) demonstraram que a eficiência de extração dos óleos é função da espécie em questão, visto que a maior absorbância ( $\lambda = 450$  nm) do extrato de *P. tricornutum* foi obtida com óleo de canola, enquanto *C. muelleri* apresentou maior absorbância em seu extrato com o óleo de girassol e *T. fluviatilis* com óleo de café. Estes resultados permitem concluir que a eficiência de extração de carotenoides dos óleos é espécie-dependente, sugerindo efeitos de interação e afinidade da composição em ácidos graxos dos óleos vegetais com os constituintes da biomassa.

Comparando-se quimicamente os óleos vegetais aos solventes orgânicos, admite-se os primeiros como matrizes complexas formadas por diversos ácidos graxos. De outra forma, os solventes orgânicos ocorrem como substâncias puras nas condições experimentais. A composição de óleos vegetais não é tão somente complexa, como também sofre variações mesmo entre amostras de uma mesma fonte (espécie vegetal). Analisando o perfil de ácidos graxos dos óleos vegetais utilizados neste estudo (**Anexos 1, e 2**), percebe-se a variação de composição entre aquelas matrizes. Como exemplo, cita-se o óleo de canola que tem o ácido oleico como composto majoritário, enquanto os óleos de girassol e café apresentam os ácidos linoleico e palmítico em maiores concentrações, respectivamente.

A variabilidade de composição em ácidos graxos de óleos vegetais recomenda, portanto, a adoção de um controle de qualidade rigoroso e frequente quando este é utilizado como veículo de extração de compostos bioativos, de modo a *i.* garantir a homogeneidade composicional dos lotes de produção e, *ii.* atender a exigências mínimas de qualidade.

Os óleos de canola, café e arroz revelaram maior eficiência de extração de carotenoides da espécie *P. tricornutum*. Para a microalga *T. fluviatilis*, maiores conteúdos foram obtidos com óleos de gergelim, uva e café verde e para *C. muelleri*, as maiores concentrações foram obtidas com os óleos de gergelim, girassol e milho (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Absorbâncias (n=3) dos extratos em óleos vegetais de *P. tricornutum* (PTR), *C. muelleri* (CMU) e *T. fluviatilis* (TFL), determinadas por espectrofotometria Uv-visível ( $\lambda = 450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferenciam médias entre diferentes óleos e letras maiúsculas entre as espécies.

Óleo de extração	Absorbância ( $\lambda = 450$ nm)		
	PTR	CMU	TFL
<i>Canola</i>	2,58 ± 0,03 <sup>aA</sup>	2,37 ± 0,14 <sup>bcA</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>bcB</sup>
<i>Gergelim</i>	1,75 ± 0,10 <sup>bB</sup>	2,75 ± 0,10 <sup>aA</sup>	0,50 ± 0,05 <sup>aC</sup>
<i>Girassol</i>	1,94 ± 0,02 <sup>bB</sup>	2,84 ± 0,10 <sup>aA</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>cC</sup>
<i>Milho</i>	1,97 ± 0,06 <sup>bB</sup>	2,60 ± 0,17 <sup>abA</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>cC</sup>
<i>Soja</i>	0,66 ± 0,02 <sup>cB</sup>	2,12 ± 0,16 <sup>cA</sup>	0,13 ± 0,07 <sup>bcC</sup>
<i>Uva</i>	1,93 ± 0,06 <sup>bB</sup>	2,19 ± 0,07 <sup>cA</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>abC</sup>
<i>Café</i>	2,51 ± 0,04 <sup>aA</sup>	2,37 ± 0,09 <sup>bcA</sup>	0,67 ± 0,05 <sup>aB</sup>
<i>Arroz</i>	2,51 ± 0,05 <sup>aA</sup>	2,13 ± 0,10 <sup>cB</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>bcC</sup>
<i>Algodão</i>	0,55 ± 0,01 <sup>cB</sup>	0,92 ± 0,02 <sup>dA</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>cC</sup>

#### 4.8. Otimização da extração de carotenoides com óleos vegetais

Para otimizar o processo de extração utilizando óleos vegetais, quatro metodologias foram avaliadas, considerando-se os efeitos do tempo de extração e do uso de aparatos de microondas e ultrassom. O óleo de canola foi escolhido por propiciar maior rendimento de extração

de carotenoides para *P. tricornutum*, a microalga que apresentou maior potencial como fonte de carotenoides.

#### 4.8.1. Tempo de extração à 28°C

Na extração de carotenoides utilizando óleos vegetais à 28°C, observou-se que o meio de extração apresenta menor intensidade de cor comparativamente ao solvente orgânico. Supõe-se que os óleos, por apresentarem uma viscosidade mais alta, precisam de mais tempo para saturar as células e partículas da biomassa. De fato, constatou-se um incremento lento e gradual de carotenoides nos extratos ao longo do período experimental (**Tabela 5**). Todavia, após 24 h de extração, a quantidade de carotenoides totais (36,74 mg g<sup>-1</sup> ms) extraída pelo óleo de canola foi bastante inferior ao obtido com solvente orgânico (104,21 mg g<sup>-1</sup> ms) (**Tabela 1**).

**Tabela 5:** Teor de carotenoides totais (mg/g de matéria seca) dos extratos em óleo de canola de *P. tricornutum*, consoante aos tempos de extração á 28°C (n=3), determinado por espectrofotometria UV-vis ( $\lambda=450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p<0,05$ ).

Tempo de extração (h)	Catotenoides totais (mg/g matéria seca)
0	2,78 ± 0,01 <sup>h</sup>
1	8,29 ± 0,03 <sup>g</sup>
2	11,95 ± 0,08 <sup>e</sup>
3	13,53 ± 0,15 <sup>d</sup>
4	13,08 ± 0,17 <sup>d</sup>
5	11,38 ± 0,07 <sup>f</sup>
6	15,76 ± 0,45 <sup>c</sup>
12	23,98 ± 0,12 <sup>b</sup>
24	36,74 ± 0,08 <sup>a</sup>

#### 4.8.2. Extração assistida por microondas

A exposição das biomassas em estudo à radiação microondas (**Tabela 6**), reduziu significativamente o tempo necessário para extração em relação ao método convencional (28°C, **Tabela 5**), uma vez que com 50s, o processo de extração por microondas já totalizou 75% do total extraído em 1 h a 28°C. Ressalta-se que este método, comparativamente aos demais em estudo, apresentou maior eficiência, considerando o tempo de extração.

A desvantagem da extração por microondas refere-se ao aquecimento causado pela radiação à biomassa, uma condição favorável à degradação de carotenoides sensíveis às altas temperaturas.



**Tabela 6:** Conteúdo de carotenoides totais (mg/g matéria seca) dos extratos de *P. tricornutum* em óleo de canola, ao longo de três períodos amostrais. A extração dos pigmentos foi assistida por microondas (n=3) e os teores determinados por espectrofotometria UV-vis ( $\lambda = 450$  nm). Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

<b>Tempo de extração (s)</b>	<b>Carotenoides totais (mg/g matéria seca)</b>
<b>10</b>	3,02 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>30</b>	4,06 ± 0,74 <sup>b</sup>
<b>50</b>	6,26 ± 0,03 <sup>a</sup>

#### **4.8.3. Extração assistida por ultrassom**

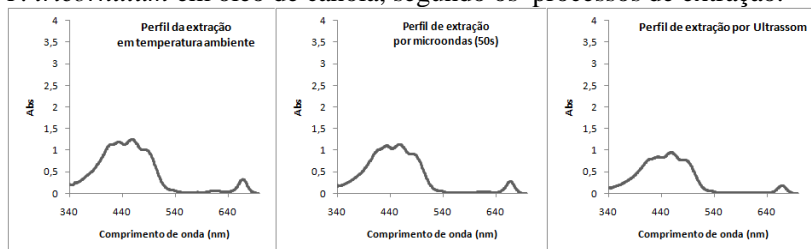
A extração assistida por ultrassom durante 1h gerou valores de recuperação dos metabólitos alvo inferiores (5,11 mg g<sup>-1</sup> ms) ao obtido pela extração convencional (28°C), i.e., 8,29 mg g<sup>-1</sup> ms (**Tabela 5**).

#### **4.8.5. Perfis cromatográficos de extratos em óleo de canola**

Pode-se supor, devido à instabilidade dos compostos carotenóidicos a temperaturas mais elevadas, que a extração assistida por microondas (50s) possa ter causado algum tipo de degradação nos pigmentos extraídos e, conseqüentemente, alterações no perfil espectrofotométrico destes extratos. Em função desta premissa, os extratos em óleo de canola das espécies de microalgas foram analisados por espectrofotometria de varredura na região do visível ( $\lambda = 340-700$ nm) como estratégia à detecção de eventuais alterações quali/quantitativas. Observou-se (**Figura 6**) que os perfis espectroscópicos nos comprimentos de onda de interesse dos extratos obtidos por extração assistida por microondas e ultrassom não diferiram entre si e quando comparados ao observado no método de extração em temperatura ambiente. Assim, no que concerne aos resultados

espectrofotométricos na região do visível, observa-se que a composição qualitativa dos extratos mostrou-se similar para as técnicas investigadas e com óleo de canola.

**Figura 6:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de *P. tricornutum* em óleo de canola, segundo os processos de extração.



#### 4.9. Análise comparativa dos rendimentos de extração em solvente orgânico vs óleo vegetal

Para comparar a eficiência de extração do óleo de canola como veículo de extração de carotenoides em relação a solventes orgânicos (MeOH), amostras de *P. tricornutum* foram utilizadas como modelo experimental em função dos maiores teores de carotenoides previamente constatados neste estudo.

Os resultados revelaram um claro efeito do tempo de extração para uma extração satisfatória dos pigmentos carotenóidicos, quando do uso de óleo de canola como solvente extrator. Os dados da **Tabela 8** demonstram que 90% dos carotenoides foram extraídos na primeira hora com solvente orgânico (MeOH), ao passo que somente 26% daqueles pigmentos foram recuperados naquele tempo amostral com óleo de canola.

Com relação ao rendimento de extração, o solvente orgânico foi superior na extração de carotenoides em comparação ao óleo vegetal. Em 24 horas de extração, utilizando MeOH como solvente de extração, 107,30 mg de carotenoides totais.g<sup>-1</sup> ms foram obtidos, em contraposição a 32,10 mg g<sup>-1</sup> ms daqueles pigmentos extraídos com óleo de canola (**Tabela 8**).

Apesar destas diferenças, óleos vegetais apresentam algumas vantagens em relação à organossolventes, como um método limpo de

extração (solventes orgânicos precisam ser removidos ao final do processo) e pelo fato de serem veículos na fabricação de nutracêuticos, o que pode justificar sua utilização, dependendo do produto final de interesse.

**Tabela 7:** Carotenoides totais (mg/g matéria seca) de extratos metanólicos e em óleo de canola de *P. tricornutum* (n=3), conforme o tempo de extração. Médias acompanhadas pela mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferenciam médias entre diferentes tempos e letras maiúsculas diferenciam os tratamentos de MeOH e óleo de canola.

Tempo de extração	Carotenoides totais (mg/g matéria seca)	
	MeOH	Óleo de Canola
1h	96,27 ± 0,50 <sup>cA</sup>	8,33 ± 0,02 <sup>dB</sup>
6h	103,76 ± 0,51 <sup>bA</sup>	16,69 ± 0,03 <sup>cB</sup>
12h	104,00 ± 0,30 <sup>bA</sup>	22,05 ± 0,04 <sup>bB</sup>
24h	107,30 ± 0,60 <sup>aA</sup>	32,10 ± 0,43 <sup>aB</sup>

#### 4.10. Estabilidade dos compostos carotenoidicos

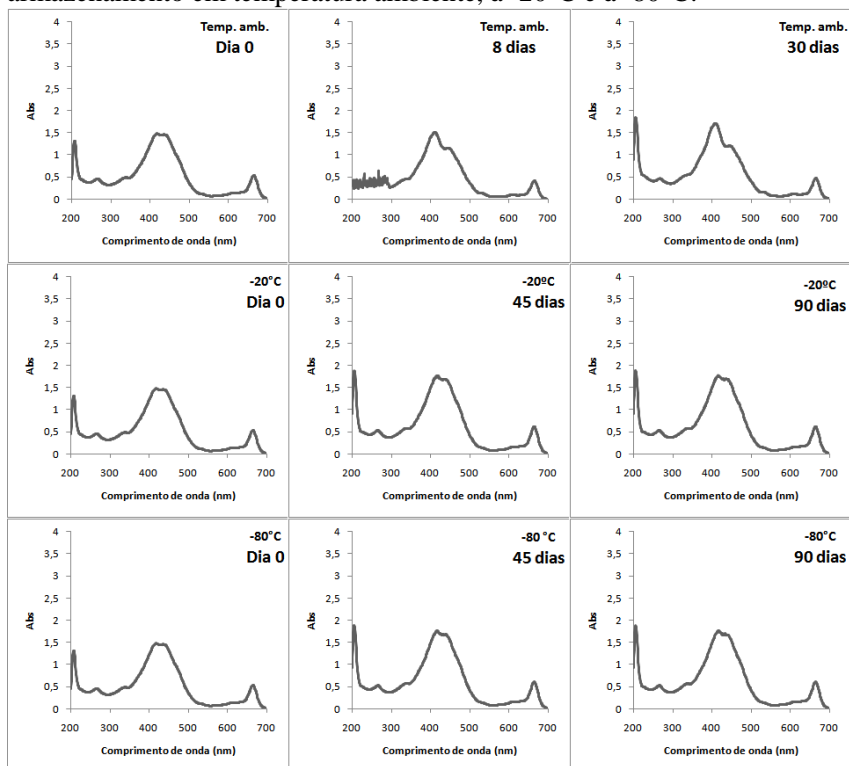
Quando os carotenoides se encontram *in situ*, i.e., nos vegetais, algas e microorganismos, são normalmente mais estáveis que na forma isolada devido ao ambiente protetor organelar e às condições especiais proporcionadas pelos tecidos circundantes e pelas interações moleculares de agregação e cristalização e ainda pela presença de antioxidantes naturais (BRITTON *et al.*, 2009). Sabe-se que os fatores mais críticos à estabilidade de carotenoides são a exposição ao oxigênio, à luz, às altas temperaturas e ao meio ácido, podendo ainda sofrer alterações por oxidação enzimática ou não e isomerização geométrica (BRITTON *et al.*, 2009).

Os testes a seguir foram conduzidos para investigar possíveis alterações no perfil espectrofotométrico dos extratos metanólicos e das frações ricas em fucoxantina, armazenados sob três formas e em três condições de temperatura, ao longo de 90 dias.

#### 4.10.1. Estabilidade de extratos brutos

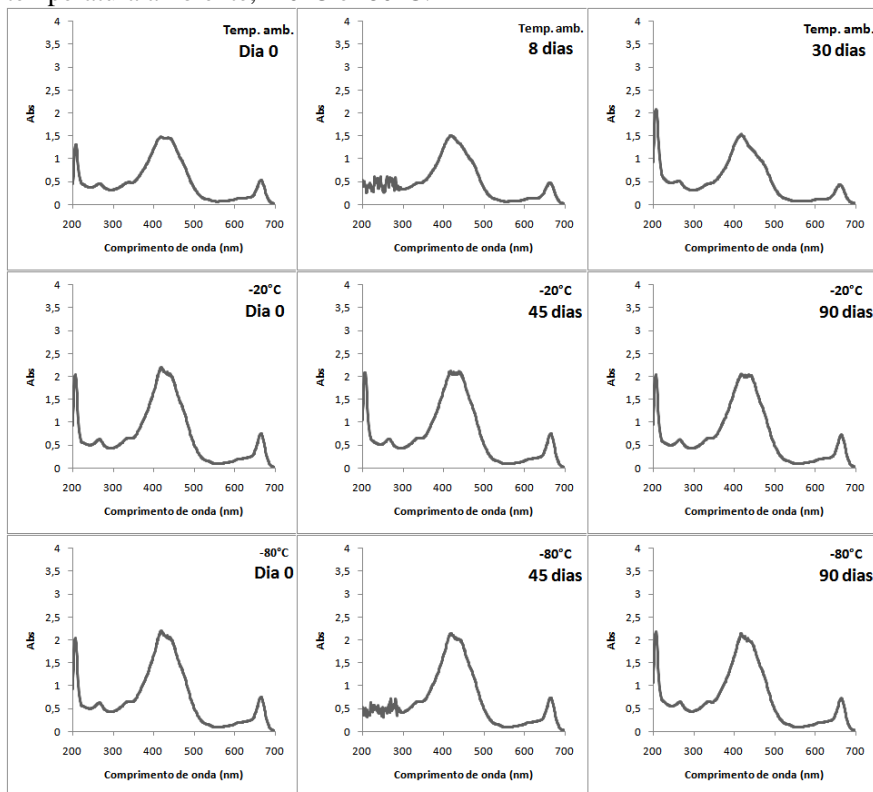
Analisando os espectros dos extratos metanólicos secos obtidos por varredura UV-vis ( $\lambda = 200-700$  nm) (**Figura 7**), observam-se claramente alterações no perfil espectral a partir de 400 nm às amostras armazenadas em temperatura ambiente, a partir do oitavo dia. Para as amostras de extrato metanólico seco, armazenadas à  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ , não foram detectadas alterações relevantes nos perfis espectroscópicos. Assim, pode-se concluir que o armazenamento dos extratos carotenóidicos em temperatura ambiente não é recomendável por períodos superiores a uma semana, fato não observado sob condições de  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ , cujas amostras mostraram-se estáveis por até 90 dias.

**Figura 7:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos metanólicos secos de *P. tricorutum*, em três momentos de armazenamento em temperatura ambiente, à  $-20^{\circ}\text{C}$  e à  $-80^{\circ}\text{C}$ .



De forma similar, amostras de extratos armazenados na presença do solvente extrator, (i.e., MeOH, sob temperatura ambiente (**Figura 8**), apresentaram alterações no perfil espectral nas regiões com absorvâncias acima de 400 nm do oitavo dia em diante. Tal fato não foi observado nas amostras conservadas à  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ , as quais mantiveram-se estáveis por 90 dias.

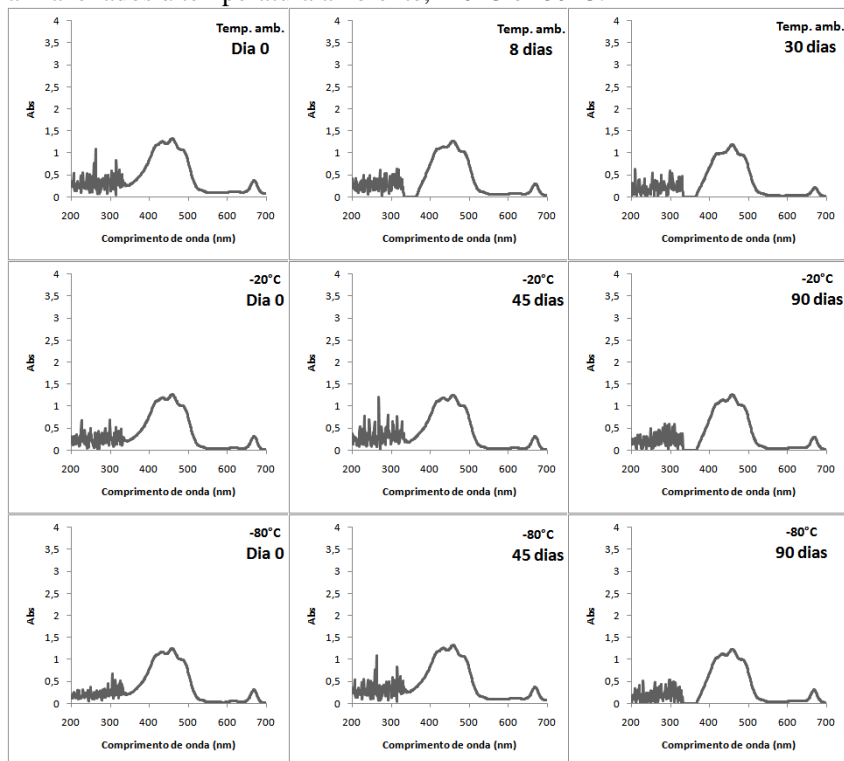
**Figura 8:** Perfis espectrofotometricos ( $\lambda = 200\text{-}700\text{ nm}$ ) dos extratos de *P. tricornerutum* em MeOH, em três momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente,  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Para os extratos armazenados em óleo de canola (**Figura 9**), observaram-se valores de absorvância próximos a zero na região espectral entre 300-400 nm para as amostras conservadas à temperatura

ambiente por 8 dias, e também aos 90 dias para aquelas congeladas (-20°C e -80°C). Assim, os resultados indicam que os extratos mostraram uma composição estável à temperatura ambiente por 30 dias, enquanto um maior período de tempo, 90 dias, foi alcançado sob condições de -20°C e -80°C.

**Figura 9:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de *P. tricornutum* em óleo de canola, em três momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente, -20°C e -80°C.

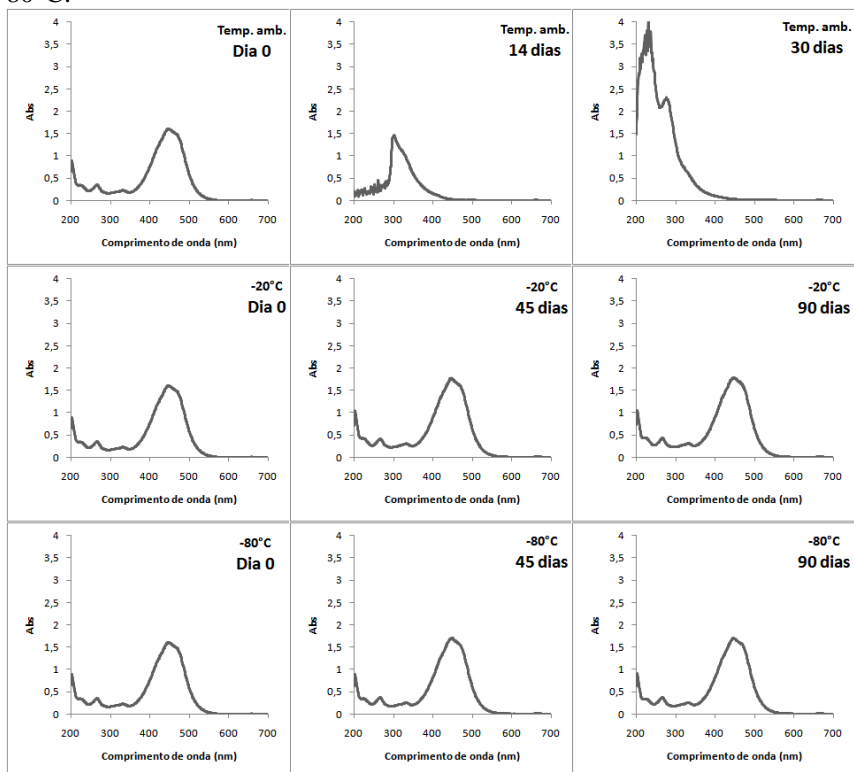


#### 4.10.2. Estabilidade da fração purificada de fucoxantina

Os extratos secos de fucoxantina (**Figura 10**), armazenados em temperatura ambiente, mostraram alterações claras em seus perfis espectrais em quase toda a região analisada (200-700 nm). Observou-se

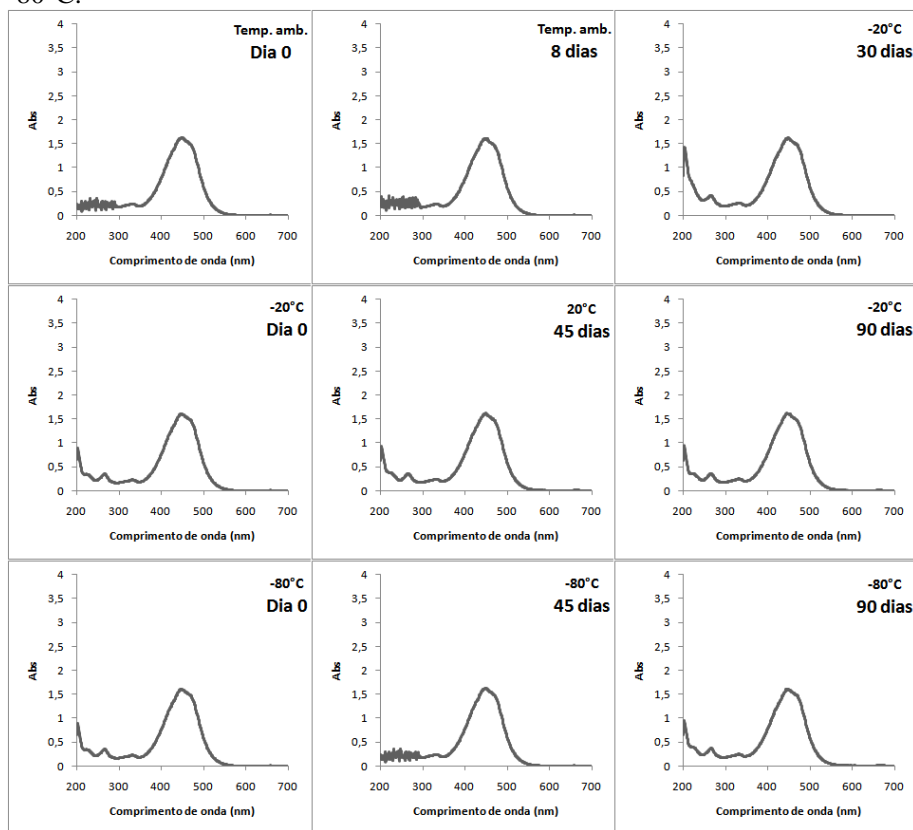
um aumento das absorbâncias na região de 200-300 nm e uma queda brusca das absorbâncias na região de interesse (400-500 nm) no décimo quarto dia. Aos trinta dias, as absorbâncias na janela espectral de 400-500 nm situaram-se próximas a zero, enquanto aquelas abaixo de 400 nm sofreram um aumento. Contrariamente, para os extratos secos de fucoxantina armazenados à  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  não foram detectadas alterações até noventa dias de armazenamento. Isto fornece um indício da forte instabilidade do extrato seco de fucoxantina sob condições de temperatura ambiente e de sua estabilidade quando armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 10:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200\text{-}700\text{ nm}$ ) dos extratos secos de fucoxantina extraída e purificada de *P. tricorutum*, em três momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente,  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Os extratos purificados de fucoxantina armazenados em MeOH (**Figura 11**) não mostram alterações em seus perfis espectrais na região de 300-700 nm em nenhuma das condições térmicas de armazenamento. Assim, pode-se considerar que os extratos de fucoxantina em MeOH, são estáveis por até 30 dias em temperatura ambiente, alcançando 90 dias a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ .

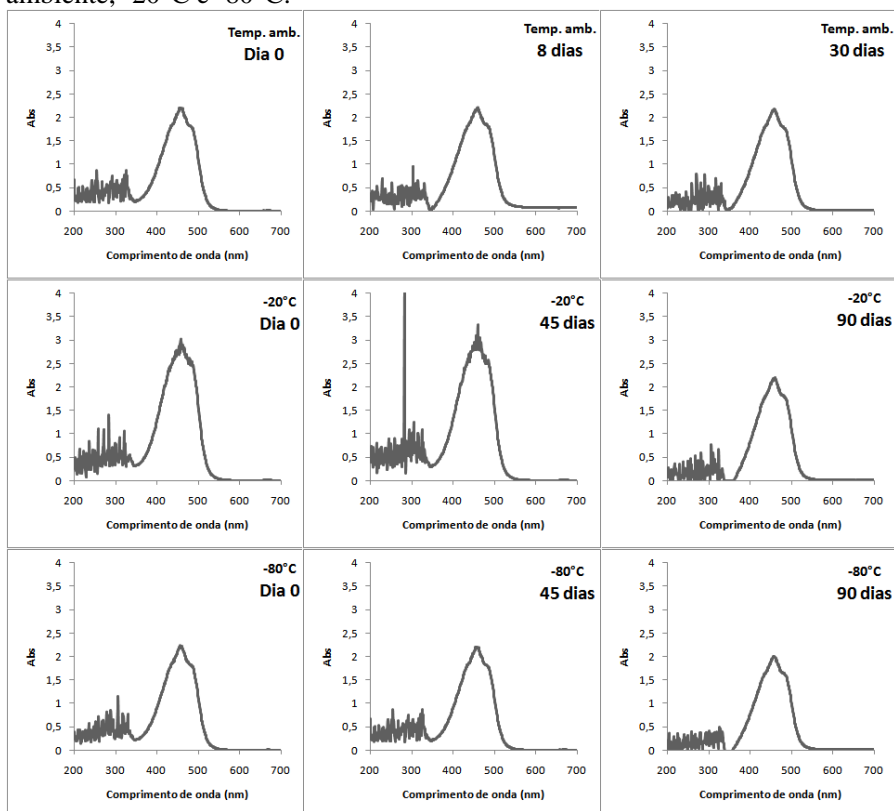
**Figura 11:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200-700$  nm) dos extratos de fucoxantina em MeOH, extraída e purificada de *P. tricornutum*, em três momentos amostrais, armazenados à temperatura ambiente,  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ .





Para os extratos de fucoxantina armazenados em óleo de canola (**Figura 12**) foram observados resultados similares aos extratos homólogos brutos, i.e., extratos brutos em óleo de canola (**Figura 9**). Em função disto, sugere-se que a fração enriquecida em fucoxantina armazenada em óleo de canola apresenta estabilidade por até 30 dias à temperatura ambiente, sendo este período triplicado sob condições à  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 12:** Perfis espectrofotométricos ( $\lambda = 200\text{-}700\text{ nm}$ ) dos extratos de fucoxantina em óleo de canola, extraída e purificada de *P. tricorutum*, em três momentos diferentes, armazenados em temperatura ambiente,  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ .



Em síntese, com relação à estabilidade dos carotenoides, constatou-se que todos os extratos armazenados à  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  mostraram-se estáveis por até noventa dias, no que se refere à região espectral que engloba as absorvâncias dos pigmentos de interesse (400-500 nm).

Sabe-se que os carotenoides são particularmente sensíveis à luz, ao oxigênio e às altas temperaturas. No presente estudo, destaca-se que as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz.

GOUVEIA *et. al.* (2007), testaram a estabilidade de carotenoides extraídos de *Chlorella vulgaris* em óleo de soja, armazenados em temperatura ambiente e protegidos da luz por cerca de 50 dias. Não foram detectadas alterações na concentração de carotenoides, cor e conteúdo de ácidos graxos do óleo, sugerindo que além da proteção que o óleo confere aos pigmentos, estes últimos podem contribuir à estabilidade do óleo devido ao seu efeito antioxidante.

Em outro estudo GOUVEIA *et. al.*, (2003) determinaram a estabilidade de carotenoides das espécies *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis* nas respectivas biomassas e em extratos organossolventes (acetona), armazenados em temperatura ambiente, com e sem exposição a luz, a  $-18^{\circ}\text{C}$ , sob vácuo e em atmosfera de nitrogênio. Os autores reportaram que os pigmentos foram consideravelmente mais estáveis na biomassa seca sob vácuo (80-90%, em 1,5 anos) em contraposição aos extratos em acetona, onde a perda de carotenoides foi quase total em um curto período de tempo (15-30 dias). Os autores concluem que a estabilidade da biomassa é predominantemente afetada pela luz e, em segundo plano, pelo conteúdo de oxigênio, ao passo que a temperatura de armazenamento tem uma importância consideravelmente menor.

Carotenoides sintéticos são usualmente adicionados de óleo vegetal para comercialização, uma vez que isto aumenta a estabilidade dos mesmos quando comparados a sua forma pura cristalina. De forma semelhante, carotenoides de origem natural também são comercializados em óleo vegetal, como aqueles extraídos de *Dunaliella salina*, por exemplo (MORTENSEN, 2009). Este fato pode explicar porque os extratos armazenados em óleo não sofreram alterações no perfil na região de absorção dos carotenoides.

Quando carotenoides são extraídos de fontes naturais e o solvente é evaporado, o resíduo é chamado oleoresina e contém os carotenoides além de outros compostos solúveis em óleo, como triacilgliceróis, esteróis e ceras, sendo estas últimas normalmente

removidas por aumentar a viscosidade e diminuir a estabilidade (MORTENSEN, 2009). De outra forma, sugere-se que nos extratos secos as condições físico-químicas possam facilitar a ação do oxigênio com os carotenoides, interferindo na estabilidade dos pigmentos.

## 5. Conclusões

O protocolo adaptado neste estudo mostrou-se eficiente para isolar e purificar fucoxantina com graus satisfatórios de pureza.

A espécie *P. tricornutum* mostrou ser a fonte potencial de carotenoides e de fucoxantina em relação as demais espécies analisadas neste trabalho,

O carotenoide majoritário das espécies em estudo, identificado por CLAE e CCD, foi a fucoxantina.

Os espectros de LC-MS confirmam a identidade da fucoxantina, e os valores de fragmentação encontrados estão de acordo com o reportado na literatura por diversos autores para este metabólito.

Óleos vegetais têm potencial de extração de carotenoides de diatomáceas.

Os óleos de canola, café e arroz apresentaram o maior potencial de extração de carotenoides de *P. tricornutum*.

Dos quatro métodos utilizados para otimizar as extrações de carotenoides, o uso de microondas permitiu maiores rendimentos em menor tempo. Todavia, maiores teores daqueles pigmentos foram alcançados pelo método convencional, com 24 h de incubação amostral.

O tempo necessário à extração de carotenoides com óleos vegetais é significativamente maior quando comparado a extração com solvente orgânico. Além disto, o potencial de óleos vegetais na extração de carotenoides das espécies deste estudo é significativamente inferior ao observado via extração com solvente orgânico.

Os compostos carotenoidicos nos extratos brutos e nas frações ricas em fucoxantina mostraram-se estáveis quando armazenados à -20°C e -80°C por até 90 dias.

Os carotenoides nos extratos brutos em óleo de canola e nas frações ricas em fucoxantina em óleo de canola e em MeOH, apresentaram-se estáveis quando armazenados em temperatura ambiente por até 30 dias. Tais compostos nos extratos brutos secos e em MeOH e nas frações secas ricas em fucoxantina não foram

estáveis à temperatura ambiente, evidenciando sinais de instabilidade no oitavo dia de armazenamento.

## 6. Referências bibliográficas

- ASHOKKUMAR, S.; MANIMARAN, K.; KIM, K. Cultivation and Identification of Microalgae (Diatom). In: **Marine Algae Extracts - Processes, products and applications - Volume 1** (ed. Kim, S.; Chojnacka, K.). Published by Wiley-VCH, Germany, pp. 59-77.2015.
- BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M. & DAVID, J.P. 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29: 113-123.
- BRENNAN, L. *et al.* 2010. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 557-577.
- BRITTON, G.; KHACHIK, F. Chapter 3: Carotenoids in food. In: **Carotenoids - Volume 5: Nutrition and Health** (ed. by Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.). Birkhäuser Publishing, pp. 45-65. 2009.
- BRITTON, G.; LIAAEN-JENSEN, S.; PFANDER, H. Chapter 1: Editors' Introduction: A Healthy Debate. In: **Carotenoids - Volume 5: Nutrition and Health** (ed. by Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.). Birkhäuser Publishing, pp. 45-65. 2009.
- CHOJNACKA, K.; KIM, S. Introduction of Marine Algae Extracts. In: **Marine Algae Extracts - Processes, products and applications - Volume 1** (ed. Kim, S.; Chojnacka, K.). Published by Wiley-VCH, Germany, pp. 1-13. 2015.
- CONTRERAS, R.; J. PANIAGUA-MICHEL; OLMOS, J. Identification of Microalgae Producers of Commercially Important Compounds. In: **Marine Algae Extracts - Processes, products and applications - Volume 1** (ed. Kim, S.; Chojnacka, K.). Published by Wiley-VCH, Germany, pp. 229-243. 2015.
- CROZIER, A. *et al.* Chapter 3: Terpenes. In: Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet.(ed. Crozier, A.; Clifford, M. N., Ashihara, H.). Published by Blackwell Publishing Ltd, pp. 47-101.2006.

CRUPI, P., TOCI, A. T., MANGINI, S., WRUBL, F., RODOLFI, L., TREDICI, M. R., COLETTA, A., ANTONACCI, D. Determination of fucoxanthin isomers in microalgae (*Isochrysis* sp.) by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector multistage mass spectrometry coupled with positive electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2013, 27, 1027-1035.

DAMBEK, M., EILERS, U., BREITENBACH, J., STEIGER, S., BÜCHEL, C., SANDMANN, G. 2012. Biosynthesis of fucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Experimental Botany* 63: 5607-5612.

DE MARTINO, A. *et al.* 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (BACILLARIOPHYCEAE) accessions. *Journal of Phycology* 43: 992-1009.

D'ORAZIO, N. *et al.* 2012. Fucoxantin: a treasure from the sea. *Mar. Drugs*, 10: 604-616.

EILERS, U.; BIKOULIS, A.; BREITENBACH, J.; BÜCHEL, C.; SANDMANN, G. 2015. Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Applied Phycology*. doi: 10.1007/s10811-015-0583-8.

FOO, S. C. *et al.* 2015. Efficient solvent extraction of antioxidant-rich extract from a tropical diatom, *Chaetoceros calcitrans* (Paulsen) Takano 1968. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5: 834-840.

FUNG, A. *et al.* 2013. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry* 136: 1055–1062.

GOUVEIA, L.; NOBRE, B. P.; MARCELO, F. M.; MREJEN, S.; CARDOSO, M. T.; PALAVRA, A. F.; MENDES, R. L. 2007. Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*, 101: 717–723.

GOUVEIA, L.; EMPIS, J. 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4: 227–233.

GUILLARD, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of marine invertebrates animals** (ed. Smith, W.L., Chanley, M.H.). Plenum Book Publ. Corp, New York, pp. 26-60. 1975.

HOFFMANN, E. de; STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3rd. ed. John Wiley & Sons Ltd. England. 2007.

HUMPHREY, A. J.; BEALE, M. H. Terpenes. In: CROZIER, A. *et al.* *Plant secondary metabolites. Occurrence, structure and role in the human diet.* Blackwell Publishing, 2006.

JEFFREY, S. W. *et al.* Phytoplankton pigments in oceanography. UNESCO Publishing, Paris. 1997.

JOHNSON, L. A., LUSAS, E. W. Comparison of alternative solvents for oils extraction. Journal of The American Oil Chemists' Society, 1983, 60: 229-242.

KANDA, H.; KAMO, Y.; MACHMUDAH, S.; WAHYUDIONO.; GOTO, M. 2014. Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether. *Marine Drugs*, 12:2383–2396.

KIM, S. M. *et al.* 2012. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166:1843–1855.

KRICHNAVARUK, S.; SHOTIPRUK, A.; GOTO, M.; PAVASANT, P. 2008. Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent. *Bioresource Technology*, 99: 5556–5560.

LANN, K. L.; FERRET, C.; VANMEE, E.; SPAGNOL, C.; LHUILLERY, M.; PAYRI, C.; STIGER-POUVREAU, V. 2012. Total phenolic, size fractionated phenolics and fucoxanthin content of tropical Sargassaceae (Fucales, Phaeophyceae) from the South Pacific Ocean: Spatial and specific variability. *Phycological Research*, 60: 37–50.

LESSER, M.P. 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68: 253–78.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações*. São Carlos, RiMa, 2006.

LAKMAL, H. H. C.; SAMARAKOON, K. W.; JEON, Y. Enzyme-assisted extraction to prepare bioactive peptides from microalgae. In: **Marine Algae Extracts - Processes, products and applications - Volume 1** (ed. by Kim, S.; Chojnacka, K.). Published by Wiley-VCH, Germany, pp. 305-317. 2015.

MAEDA, H. *et al.* 2007. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK-Ay Mice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55: 19-24.

MATHEWS-ROTH, M.M. 1997. Historical review: carotenoids and photoprotection. *Photochemistry and Photobiology* 65: 148-151.

MCNULTY, H., BYUN J., LOCKWOOD, S. F., JACOB, R. F. MASON, R. P. 2007; Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768: 167-174.

MENDIOLA, J. A. *et al.* 2007; TORRES, C. F., TORÉ, A., MARTÍN-ALVAREZ, P. J., SANTOYO, S., ARREDONDO, B. O., SEÑORÁNS, F. J., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E. Use of supercritical CO<sub>2</sub> to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content. *Eur Food Res Technol*, 224: 505-510, 2007.

MORTENSEN, A. Supplements. In: *Carotenoids - Nutrition and Health* (ed. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.). Birkhäuser Publishing, pp. 67-80. 2009.

MÜLLER, M. C. *et al.* 2003. Carotenoides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação de nutrientes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39: 4-7.



NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 6 ed. São Paulo: Sarvier, 2013.

PANGESTUTI, R, *et al.* 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* 3: 255 –266.

PUBCHEM (2015). Open Chemistry Database, USA, URL [http://https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fucoxanthin#section=Information-Sources\\_](http://https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fucoxanthin#section=Information-Sources_)

RAVEN, H. P. *et al.* *Biologia vegetal*. 7º ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2007.

RMIKI, N. Chapter 20: Carotenoids and stress in higher plants and algae. In: *Handbook of plant and crop stress*. Second edition, revised and expanded. Edited by Mohammad Pessarakli. pp. 465-482. 1999.

ROCKENBACH, I.I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA, L. V.; FETT, R. Composição de ácidos graxos de óleo de semente de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.) *Brazilian Journal of Food Technology*. III SSA, pp. 23-26. 2010.

ROMER, S., LUBECK, J, KAUDER, F., STEIGER, S., ADOMAT, C. & SANDMANN, G. 2002. Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. *Metabolic Engineering* 4: 263–272.

RUBIO, V. P.; J. PANIAGUA-MICHEL; OLMOS, J. Omegas: Pharmaceutical High Value Products and One of the Most Functional Bioactive Compounds. In: **Marine Algae Extracts - Processes, products and applications** (ed. Kim, S.; Chojnacka, K.). Published by Wiley-VCH, Germany, pp. 229-243. 2015.

SILVA, F. A. S. 2015. *Software Assistat - Assistência Estatística*. Universidade Federal de Campina Grande, Brasil. URL <http://www.assistat.com>.

SZÉCHY, M.T.M. & PAULA, E.J. 2000. Padrões estruturais quantitativos de bancos de *Sargassum* (Phaeophyta, Fucales) do litoral dos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 23: 121-132.

SHIRATORI, K. *et al.* 2005. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Experimental Eye Research* 81: 422–428.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SUGAWARA, T. *et al.* 2009. Esterification of xanthophylls by human intestinal Caco-2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483: 205–212.

SUN, H., YANG, Y., LI, H., ZHANG, J., SUN, N. 2012. Development of multiresidue analysis for twenty phthalate esters in edible vegetable oils by microwave-assisted extraction-gel permeation chromatography – solid phase extraction – gas chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 5532–5539.

TAKAHASHI, K. *et al.* 1999. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60. *Food Science and Technology Research*, 5: 243–246.

TAKAICHI, S. 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions. *Marine Drugs*, 9: 1101–1118.

TAPIERO, H., TEW, K.D., NGUYEN BA, G. & MATHE, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedical Pharmacotherapy*, 56: 200–207.

UENOJO, M., MAROSTICA JUNIOR, M.R. & PASTORE, G.M. 2007. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para a formação de compostos de aroma. *Química Nova* 30: 616–622.

VALDUGA, E., TATSCH, P. O., TIGGEMANN, L., TREICHEL, H., TONIAZZO, G., ZENI, J., DI LUCCIO, M., JÚNIOR, A. F. 2009. Produção de carotenoides: Microorganismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova* 32: 2429–2436.

WANG, X., LIANG, J., LUO, C., CHEN, C., GAO, Y. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom

*Chatoceros muelleri* in response to different CO<sub>2</sub> levels. *Bioresource Technology*, 161: 124-130, 2014.

YI, Z., XU, M., MAGNUSDOTTIR, M., ZHANG, Y., BRYNJOLFSSON, S., FU, W. Photo-oxidative stress-driven mutagenesis and adaptive evolution on the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* for enhanced carotenoid accumulation. *Marine Drugs* 13: 6138-6151, 2015.

ZAILANIE, K., SUKOSO. Study on of fucoxanthin content and its identification in brown algae from Padike Vilage Talango District, Madura Islands. *Journal of Life Science and Biomedicine*, 4(1): 01-03, 2014.

ZHANG, Y., WU, H., WEN, H., FANG, H., HONG, Z., YI, R., LIU, R. Simultaneous determination of *fucoxanthin* and its deacetylated metabolite fucoxanthinol in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Marine Drugs*, 13: 6521-6536, 2015.



## 7. Anexos

**Anexo 1: Perfil de ácidos graxos (%) dos óleos vegetais investigados.**

Nome	Fórmula	Algodão (%)	Arroz (%)	Canola (%)	Canola (%)	Girassol (%)
<i>Mirístico</i>	C14:0	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Palmítico</i>	C16:0	23,37	18,81	4,27	5,19	6,02
<i>Esteárico</i>	C18:0	2,10	1,59	1,68	2,47	2,99
<i>Oléico</i>	C18:1n9c	15,83	42,17	64,02	66,19	35,29
<i>Linoléico</i>	C18:2n6c	58,11	36,12	21,46	22,55	54,81
<i>Linolénico</i>	C18:3n3	0,00	1,30	8,56	3,59	0,89
<i>Saturados</i>		26,06	20,40	5,96	7,66	9,01
<i>Insaturados</i>		73,94	79,60	94,04	92,34	90,99
<i>Monosaturados (Oleico)</i>		15,83	42,17	64,02	66,19	35,29
<i>Poliinsaturados</i>		58,11	37,43	30,02	26,15	55,70
<i>Ômega 9</i>		15,83	42,17	64,02	66,19	35,29
<i>Ômega 6</i>		58,11	36,12	21,46	22,55	54,81
<i>Ômega 3</i>		0,00	1,30	8,56	3,59	0,89
Nome	Fórmula	Milho (%)	Soja (%)	Gergelim (%)	Gergelim (%)	
<i>Mirístico</i>	C14:0	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>Palmítico</i>	C16:0	12,47	10,92	9,84	8,47	
<i>Esteárico</i>	C18:0	1,90	3,25	5,36	6,31	
<i>Oléico</i>	C18:1n9c	35,81	23,77	41,50	40,44	
<i>Linoléico</i>	C18:2n6c	49,17	56,93	42,68	43,77	
<i>Linolénico</i>	C18:3n3	0,65	5,13	0,00	0,00	
<i>Saturados</i>		14,37	14,17	15,20	14,78	
<i>Insaturados</i>		85,63	85,83	84,80	85,22	
<i>Monosaturados (Oleico)</i>		35,81	23,77	41,50	40,44	
<i>Poliinsaturados</i>		49,82	62,06	42,68	43,77	
<i>Ômega 9</i>		35,81	23,77	41,50	40,44	
<i>Ômega 6</i>		49,17	56,93	42,68	43,77	
<i>Ômega 3</i>		0,65	5,13	0,00	0,00	

**Anexo 2:** Perfil de ácidos graxos (%) de dois lotes de óleo de café verde.

Nome	Café Verde 1 (%)	Café Verde 2 (%)
<i>Palmítico ( C16:0)</i>	43,31	42,15
<i>Esteárico( C18:0)</i>	7,05	6,87
<i>Oléico ( C18:1n9c)</i>	7,15	7,08
<i>Linoléico( C18:2n6c)</i>	37,75	38,53
<i>Gama-linolênico (C18:3n6)</i>	2,08	2,31
<i>Alfa-linolênico (C18:3n3)</i>	1,32	1,40
<i>Cis-8, 11, 14- Eicosatrienóico(C20:3n6)</i>		0,41
<i>Outros</i>	0,98	0,88
	0,36	0,38