

Lagostim *Procambarus clarkii*: estudo de compostos bioativos de elevado valor comercial para sua valorização

*Crayfish *Procambarus clarkii*: study of high commercial value bioactive compounds for their valorization*

Patrícia Ricardo¹, Ana Sanches-Silva^{2,3}, Maria Conceição Castilho¹, Fernando Ramos^{1,5}

anateress@gmail.com

(1) Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

(2) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Polo de Vairão, Vila do Conde, Portugal.

(4) Centro de Estudos de Ciência Animal, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

(5) Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

_Resumo

O lagostim *Procambarus clarkii* possui várias características que fazem dele uma espécie com grande carácter invasivo, devido a características de reprodução (taxa de crescimento elevada, alta fecundidade, maturidade precoce, várias gerações num ano), bem como características de plasticidade ecológica (tolerância a diversas condições ambientais e a diversos recursos alimentares). Neste estudo foi determinado o teor de astaxantina e de α -tocoferol no lagostim *Procambarus clarkii* e nos seus componentes (cefalotórax, exoesqueleto e porção edível) por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a detetor de díodos. A influência do processo de cozedura também foi avaliada. O exoesqueleto do lagostim obteve a concentração de astaxantina mais elevada ($22,7 \pm 0,9 \mu\text{g/g}$), seguido do cefalotórax e da parte edível quer nas amostras processadas termicamente (cozidas) quer nas não processadas (cruas). As amostras cozidas evidenciaram uma coloração mais intensa pois o aumento da temperatura provoca a desnaturação das carotenoproteínas levando à libertação da astaxantina. No caso do α -tocoferol, o cefalotórax do lagostim não processado termicamente foi o componente com maior concentração ($58,6 \pm 1,7 \mu\text{g/g}$). O lagostim invasor *Procambarus clarkii* pode ser considerado uma boa fonte natural de astaxantina, sendo um poderoso antioxidante, com inúmeras aplicações na tecnologia alimentar e na nutrição humana e animal.

_Abstract

The crayfish *Procambarus clarkii* has several characteristics that make it a highly invasive species due to reproduction characteristics (high growth rate, high fecundity, early maturity, several generations in a year), as well as characteristics of ecological plasticity (tolerance to different environmental conditions and several food resources). In this study, the content of astaxanthin and α -tocopherol in the crayfish *Procambarus clarkii* and its components (cephalothorax, exoskeleton and edible portion) was determined by Ultra Efficiency Liquid Chromatography coupled to a diode array detector. The influence of the cooking process was also evaluated. The crayfish exoskeleton presented the highest astaxanthin concentration ($22.7 \pm 0.9 \mu\text{g/g}$), followed by the cephalothorax and the edible portion, both in the thermally processed samples (boiled) and in the raw (unprocessed) samples. The boiled samples showed a more intense coloration because the increase in temperature causes denaturation of the carotenoproteins leading to the release of astaxanthin. In the case of α -tocopherol, the cephalot-

horax of the unprocessed crayfish was the component with the highest concentration ($58.6 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$). The invasive crayfish *Procambarus clarkii* can be considered a good natural source of astaxanthin, being a powerful antioxidant with various applications in food technology and in human and animal nutrition.

_Introdução

O lagostim *Procambarus clarkii* é um crustáceo invasor, que atualmente representa uma praga ambiental no território nacional (1). Esta espécie também está incluída na lista das espécies que mais ameaçam a biodiversidade aquática na Europa (2).

A obtenção de astaxantina através de subprodutos de crustáceos tem sido amplamente estudada pelo facto deste composto bioativo ser um dos antioxidantes naturais mais poderosos e economicamente valiosos devido às suas funções biológicas (2-5). No caso específico do lagostim invasor *P. clarkii*, o teor de astaxantina também tem sido investigado (6-9).

Em Portugal, esta espécie tem sido estudada na área da ecologia, devido ao seu impacto na biodiversidade e aos danos causados na orizicultura (1). Contudo, o presente estudo teve uma perspetiva diferente, nomeadamente, na caracterização e valorização desta espécie exótica através do estudo de compostos bioativos de elevado valor comercial e com inúmeras aplicações biomédicas, na tecnologia alimentar e na alimentação animal.

_Objetivos

Neste estudo pretendeu-se determinar o teor de astaxantina e de α -tocoferol no lagostim *Procambarus clarkii* e nos seus subprodutos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) acoplada a detetor de díodos (do inglês, *Diode Array Detector*, DAD). Serão comparados os teores de astaxantina e de α -tocoferol nos diferentes componentes do lagostim (cefalotórax, porção edível e exoesqueleto), assim como, a influência do processo de cozedura no teor dos mesmos.

_Material e métodos

As amostras de lagostim selvagem *Procambarus clarkii* usadas para a determinação da astaxantina e do α -tocoferol foram capturadas nos campos de arroz de Montemor-o-Velho (Coimbra), em janeiro de 2013. Para a análise foram utilizados indivíduos em diferentes estádios de crescimento (juvenis e adultos). Os lagostins, crus e cozidos, foram divididos em porção edível, exoesqueleto e cefalotórax. Os lagostins inteiros, também foram analisados de forma a estabelecer uma comparação.

Para as análises de quantificação foi usado o padrão de astaxantina fornecido por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha) e o padrão do α -tocoferol foi fornecido pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).


Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico HPLC. O acetonitrilo, metanol, diclorometano e o acetato de amónio, usados para a preparação da fase móvel para análise em HPLC, foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada foi obtida com um sistema de purificação Milli-Q (Billerica, EUA).

A solução padrão de astaxantina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi preparada em diclorometano. Esta solução foi armazenada à temperatura de $-80 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, devidamente protegida da luz, durante todo o processo de desenvolvimento da metodologia analítica. A partir desta solução foram realizadas diluições subsequentes em metanol, num intervalo de 0,05-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A solução padrão de α -tocoferol (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi preparada em

metanol. A partir desta foram realizadas diluições em metanol, num intervalo de 0,6-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As soluções foram devidamente protegidas da luz.

Para a preparação das amostras, 0,25 g de amostra foram pesados num tubo de 15 mL, e foram adicionados 5 mL de metanol. A amostra foi agitada no vórtex durante 1 minuto. Posteriormente, as amostras foram submetidas a banho de ultrassons durante 10 minutos, de forma a permitir a extração completa, seguidamente foram filtradas e analisadas por UHPLC-DAD.

A análise da astaxantina e α -tocoferol foi realizada num sistema de cromatografia líquida UHPLC-DAD com uma pré-coluna (UPLC[®] BEH, 2,1 x 5 mm, 1,7 μm) e uma coluna analítica (UPLC[®] BEH C18, 2,1 x 50 mm, 1,7 μm) da Waters (Milford, MA, USA). A composição da fase móvel foi baseada no estudo de Sanches-Silva *et al.* (10) e de López-Cervantes *et al.* (11). A fase móvel consistiu num gradiente de fase móvel A: diclorometano/metanol (com 0,05 M de acetato de amónio)/acetonitrilo (5:20:75, v/v/v) e fase móvel B: água ultrapura (tabela 1). O fluxo da fase móvel foi 0,5 ml/min, a temperatura da pré-coluna e coluna foi de 20 $^\circ\text{C}$ e volume de injeção foi de 10 μL .

Tabela 1:  Gradiente de eluição para a fase móvel (A): [diclorometano / metanol (com 0,05 M de acetato de amónio) / acetonitrilo 5:20:75 (v/v/v)] e (B): água ultrapura (15).

Tempo (min.)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	25	75
9	17	83
9,1	0	100
18	0	100
18,1	25	75
22	25	75

Os parâmetros de validação determinados neste estudo foram baseados nas recomendações e critérios de organizações internacionais de elevada relevância científica (12-14).

Resultados e discussão

O método usado para determinar a astaxantina e o α -tocoferol provou ser simples, rápido, seletivo e permitiu uma boa resolução a baixos níveis de deteção (figuras 1 e 2). Apresentou um limite de quantificação (LQ) de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ para a astaxantina e de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ para o α -tocoferol (15). Foi obtida boa linearidade para os dois analitos, nomeadamente, um coeficiente de determinação (r^2) de 0,9991 para a astaxantina e de 0,9994 para o

Figura 1: Cromatograma do exoesqueleto de lagostim cozido a 480 nm (15).

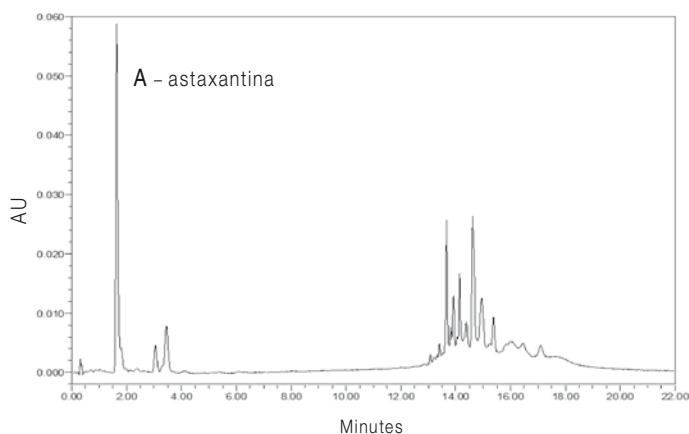
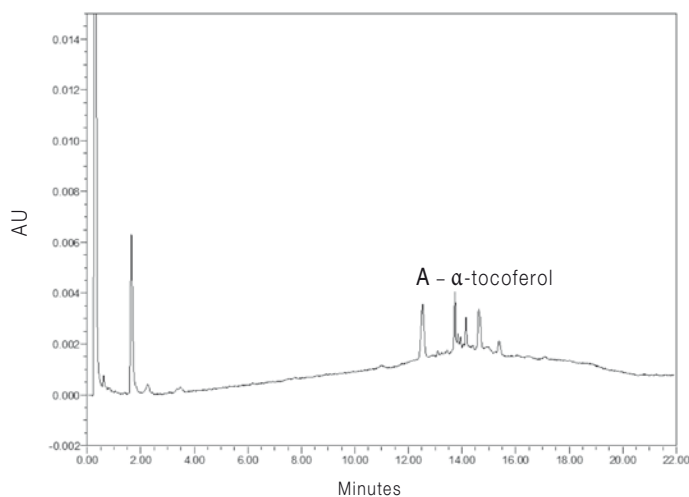


Figura 2: Cromatograma do exoesqueleto de lagostim cru a 294 nm (15).



α -tocoferol. O processo de extração da astaxantina apresentou bons resultados de recuperação nos níveis de concentração estudados, nomeadamente $97 \pm 6\%$ no exoesqueleto cozido, $99 \pm 7\%$ no cefalotórax cozido e $89 \pm 7,2\%$ no lagostim inteiro cozido. Relativamente à precisão intra-dia, obtiveram-se valores (RSD%, do inglês relative standard deviation) $\leq 4,0\%$ para a astaxantina, com exceção da amostra de cefalotórax de lagostim cozido e $\leq 6,9\%$ no caso do α -tocoferol (15).

Nas amostras processadas termicamente (cozidas) e nas não processadas (cruas), o exoesqueleto obteve a concentração de astaxantina mais elevada, seguido do cefalotórax e da parte edível (tabela 2). As amostras de exoesqueleto cozidas evidenciaram uma coloração mais intensa ($30,5 \pm 1,2$ de astaxantina/g), pois o aumento da temperatura provoca a desnaturação das carotenoproteínas levando à libertação da astaxantina (15). No caso do α -tocoferol, o cefalotórax foi o componente com maior concentração ($58,6 \pm 1,7 \mu\text{g/g}$). Sendo que, o processo de cozedura provocou uma diminuição considerável na concentração de α -tocoferol em todas as amostras.

Tabela 2: Quantidade média de astaxantina ($\mu\text{g/g}$) e α -tocoferol ($\mu\text{g/g}$) nos diferentes componentes do lagostim *P. clarkii* cru e cozido (n=3) (15).

Amostra	Componente	Astaxantina ($\mu\text{g/g}$)	α -Tocoferol ($\mu\text{g/g}$)
Cru	Exoesqueleto	$22,7 \pm 0,9$	$33,5 \pm 2,9$
	Cefalotórax	$13,4 \pm 0,2$	$58,6 \pm 1,7$
	Parte edível	$4,0 \pm 0,1$	ND
	Inteiro	$12,9 \pm 0,3$	$25,8 \pm 1,1$
Cozido	Exoesqueleto	$30,5 \pm 1,2$	$29,4 \pm 2,1$
	Cefalotórax	$15,4 \pm 1,3$	$16,8 \pm 0,3$
	Parte edível	$4,0 \pm 0,1$	$17,6 \pm 0,3$
	Inteiro	$13,4 \pm 0,4$	$22,1 \pm 0,6$

ND- Não determinado.

_Conclusão

Dos resultados obtidos conclui-se que o lagostim invasor *Procambarus clarkii* pode ser considerado uma boa fonte natural de astaxantina, sendo um poderoso antioxidante, com inúmeras aplicações na tecnologia alimentar e na nutrição humana e animal.

Referências bibliográficas:

- (1) Anastácio PM, Frias AF, Marques JC. Impact of crayfish densities on wet seeded rice and the inefficiency of a non-ionic surfactant as an ecotechnological solution. *Ecological Engineering*. 2000; 15(1-2):17-25.
- (2) Mendes RC. Resposta da comunidade de carnívoros à invasão recente dos sistemas ribeirnhos do NO de Portugal por lagostim-americano (*Procambarus clarkii*). Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2011.
- (3) Sachindra N, Bhaskar N, Mahendrakar N. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *J Sci Food Agric* 2005;8(1):167-72.
- (4) Vilasoa-Martínez M, Calaza-Ramos C, López-Hernández J, et al. Determination of vitamin E and carotenoid pigments by high performance liquid chromatography in shell of *Chionocetes opilio*. *Anal Chim Acta*. 2008;617(1-2):225-9.
- (5) Sanches-Silva A, Ribeiro T, Albuquerque TG, et al. Ultra-high pressure LC determination of glucosamine in shrimp by-products and migration tests of chitosan films. *J Sep Sci*. 2012;35(5-6):633-40.
- (6) Meyers S, Chen H. Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. *J Agr Food Chem*. 1982;30(3):469-73.
- (7) Meyers S, Chen H. Ensilage Treatment of crawfish waste for improvement of astaxanthin pigment extraction. *J Food Sci*. 1983;48(5):1516-20.
- (8) Meyers S, Chen H. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. *J Food Sci*. 1982;47(3):892-6, 900.
- (9) Meyers S.P. An integrated approach to recovery and utilization of Louisiana crawfish processing wastes. In: *International By-Products Conference*, Anchorage, Alaska: 1990.
- (10) Sanches-Silva A, Ribeiro T, Albuquerque T, et al. Ultra-high pressure LC for astaxanthin determination in shrimp by-products and active food packaging. *Biomed Chromat*. 2012;27(6):757-64.
- (11) López-Cervantes J, Sánchez-Machado D, Gutiérrez-Coronado M, et al. Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC. *Biomed Chromat*. 2006;20(10):981-4.
- (12) Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer guidance: validation of chromatographic methods. Rockville, MD: US FDA, 1994. www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf
- (13) International Conference on Harmonization. Guidance for industry: Q2B validation of analytical procedures: methodology. Rockville, MD: US FDA, 1996. www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073384.pdf
- (14) U.S. Pharmacopeia. USP 29 - Validation of Compendial Methods. 2005. Disponível em: www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html [consul. 17-1-2017].
- (15) Ricardo PMN. Quantificação de astaxantina e α -tocoferol em lagostim *Procambarus clarkii* e seus subprodutos por UHPLC-DAD e determinação da sua actividade antioxidante. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, 2013.