



1150000773

T/UNICAMP  
L78i  
BCCL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ERRO

NOME DO AUTOR

ESCORCIA

INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO INDUSTRIAL

SOBRE OS PIGMENTOS DO CAMARÃO

*Nestor Escorcía Loaisiga*

Bacharel em Química

Orientador:

*Dr. Ottilio Guernelli*

Professor Titular da Disciplina  
"Processamento Industrial" da  
Faculdade de Tecnologia de Ali-  
mentos, UNICAMP.

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas. - Estado de São Paulo - Brasil, para obtenção do título de Mestre em Ciências em Tecnologia de Alimentos.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## AGRADECIMENTOS

Ao Governo Nacional de Nicaragua, pela amabilidade de haver feito possível minha participação no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Ao Dr. Enrique Guerrero, lutador incansável pela implantação de uma "Escola Vocacional em Tecnologia de Alimentos" em Nicaragua.

Ao Professor Doutor Ottilio Guernelli, pela sua valiosa orientação e enorme paciência na dedicação deste trabalho.

A Faculdade de Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, na Exma. pessoa do Professor Doutor André Tosello, pela ajuda e facilidade ao autor.

À Organização dos Estados Americanos, pela ajuda econômica, para que este trabalho fosse realizado.

Ao Governo do Brasil, pela ajuda econômica, que prestou - ao autor, contribuindo a que este trabalho chegasse ao seu término.

Ao Professor Eng. Lincoln Camargo Neves Filho, pela desinteressada colaboração, estímulo e boa vontade, como também a muitos outros Professores, a quem sou sumamente agradecido - pois que contribuíram para que este trabalho fosse levado a bom termo e de quem gratas lembranças levarei de minha estada neste País.

## DEDICATÓRIA

A meu pai, MIGUEL ESCORCIA RIBAS, exemplo edificante de sacrifício e honestidade, que soube inculcar-me o amor ao trabalho, ao estudo e aos meus semelhantes.

A minha amada mãe, GLORIA LOAISIGA DE ESCORCIA, que através de seus conselhos, me indicou o caminho da vida, sobre tudo, a paciência e a perseverança, que têm caracterizado minha incerta existência.

A meus queridos irmãos, JOSÉ, MARITZA e YADIRA ESCORCIA DE BORGES.

À Srta.

ODETTE NORRY RODRIGUES ALVES, por ser um foco de luz, na imensidade do profundo mar, onde meu ser apenas se observa.

## INDICE

	Página.
RESUMO	
SUMARY	
INTRODUÇÃO.....	1
CAPITULO I.	
A)-.Pigmentos do crustaceos.....	3
(1).Influencia do plancto.....	5
(2).Astaxantina e astaceno.....	7
(3).Ocorrencia da astaxantina e astaceno.....	8
(4).Isolamento da astaxantina e astaceno.....	10
(5).Constituição química e derivados de astaceno.....	11
(6).Constituição química e derivados de astaxantina.....	19
(7).Comportamento da astaxantina aos processos usuais de preservação do camarão.....	25
B)-.Melanina.....	39
(1).Distribuição.....	39
(2).Causa e formação da melanina.....	40
(3).Mecanismo de formação da melanina a partir da tirosina.....	41
(4).Propriedades químicas e bioquímicas.....	44
(5).Formação da melanina no camarão durante os processos usuais de preservação.....	44
C)-.Hemocianina.....	48
(1).Distribuição.....	48
(2).Propriedades físicas e químicas.....	48
(3).Estrutura química.....	49
(4).Espectro de absorção.....	52
(5).Natureza do cobre na hemocianina.....	52
(6).A existencia de um grupo prostético na hemocianina.....	53
(7).Ponto isoelétrico.....	54
(8).Capacidade de combinação com o oxigênio.....	54

(9). Reação da hemocianina com CO e com CN .....	54
(10). Função da hemocianina.....	55
(11). Poder tampão.....	55
(12). Ação osmótica.....	55
(13). Capacidade de decompor H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	55
(14). Comparações da hemocianina dos crustaceos com os dos gastrópodos e cefalópodos.....	56
(15). Problemas não resolvidos na hemocianina .....	56
(16). Fatores de oxidação da hemocianina nos processos usuais de preservação do crustacea.....	57

## CAPÍTULO II. PROCESSAMENTO INDUSTRIAIS

### A)-.Refrigeração

(1). Sistema de refrigeração.....	58
a)- Por gelo.....	58
b)- Por imersão (salmoura ou água de mar).....	59
(2). Trocas que ocorrem durante o resfriamento do produ <u>to</u> na refrigeração por gelo e imersão.....	59
(3). Sequencia do processamento do camarão a ser refri- gerado.....	60
(4). Vantagens e desvantagens dos processos de refrige- ração.....	63

### B)-.Congelação.....

(1). Sistema de congelação.....	64
a)- Congelação por imersão.....	64
b)- Circulação de ar forçado.....	66
c)- Congelação por placas.....	67
(2). Trocas que ocorrem durante a congelação do produto.	68
a)- Congelação por salmoura.....	68
b)- Congelação por circulação de ar frio.....	71
c)- Congelação por placas.....	74
(3). Sequencia do processamento do camarão para congela- ção.....	75

(4).Fatores que podem alterar o camarão armazenado.....	79
(5).Características mais importantes dos processos de congelamento.....	81
(1)-Imersão.....	81
(2)-Circulação de ar frio.....	81
(3)-Por placas.....	81
C)-.Liofilização.....	84
(1).Congelamento previo.....	84
(2).Secagem primaria.....	88
(3).Secagem secundaria.....	90
(4).Armazenamento.....	90
(5).Características mais importantes do processo de liofilização.....	94
CAPITULO III - Preservação dos pigmentos do camarão durante os processos de refrigeração, congelamento e - liofilização.....	
(1).Astaxantina.....	95
(2).Melanina.....	96
(3).Hemocianina.....	103
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	113

## SUMARY

The chemical and biochemical behavior of the pigments in shrimp was studied in relation to refrigeration, freezing and freeze-drying:

Astaxanthin, melanin, and hemocyanin, were considered in regard to time, temperature, oxygen content, pH, moisture content, besides other variables.

During refrigeration, astaxanthin is oxidised in the presence of air, mostly under the catalytic effect of light, and during freezing it is affected by the oxidation of the insaturad fatty acids on long storage periods. Freeze-drying in the presence the oxygen and drying temperatures between 30,0 to 37,0°C lead to significant oxidation of the pigment astaxanthin

Tyrosinase is responsible for the formation of melanin in the crustacea. It is activated by the temperature (0 to 50°C), oxygen, moisture, light, copper and pH. The melanosis occurs - in the refrigeration, and freezing, at storage temperatures - over 0°C, in the presence of O<sub>2</sub>, metallic copper, moisture and pH. 6-8.

Hemocyanin is oxidised to oxyhemocyanin during refrigeration, mostly on long periods of exposure to air. Saline concentration and the presence of copper in the cuproprotein favor this process of oxidation.

Advantages and disadvantage of the mentioned processes applied to the preservation of Shrimp pigments were considered.

It is concluded that a product of best quality is obtained under following conditions.

a) Refrigeration (0 to -1°C) should be carried out immediately after capture and the storage temperature of product maintained between 0 to -1°C, for periodo not longer than 25 days.

b) Freezing (-12 to -35°C) should be carried out by air blast freezers, plate exchangers, brine, liquified gases (N<sub>2</sub> ,

Freon, etc.)

c) Melanin formation is prevented by reducing and chelating agents used in conjunction with the inactivation of tyrosinase ;

d) Oxidation which might cause serious damage to freeze -dried shrimpe, should be avoided;

e) Copper, present in the cuproprotein hemocyanin is inactivated through the sequestering action of EDTA and citric acid.

-RESUMO-

O comportamento químico e bioquímico da astaxantina, melanina e hemocianina, pigmentos do camarão, são estudados na refrigeração, congelação e liofilização e observados em relação ao tempo, temperatura, teor de oxigênio, pH, umidade e outras variáveis.

Astaxantina - Durante a refrigeração, astaxantina é oxidada pela presença de ar e principalmente pelo efeito catalítico da luz. Na congelação esse pigmento é afetado pela oxidação dos ácidos graxos insaturados durante os períodos de armazenamento.

Na liofilização em presença de oxigênio e quando a secagem é feita às temperaturas de 30° a 37°C há uma significativa oxidação desse pigmento.

Melanina - A tirosinase, responsável pela formação da melanina nos crustáceos, é ativada pela umidade, luz, oxigênio, cobre, pH e temperatura de 0° a 50°C.

Na refrigeração e na congelação a melanina aparece devido à tirosinase que é ativada pela presença de oxigênio, cobre metálico, umidade, pH entre 6 e 8 e temperatura de armazenamento acima de 0°C.

Hemocianina - Durante a refrigeração a hemocianina é oxidada a oxihemocianina; a concentração salina e a presença de cobre, sob a forma de cuproproteína, facilitam esse processo de oxidação.

Ainda neste trabalho são apresentadas as vantagens e desvantagens dos três processos, refrigeração, congelação e liofilização, na preservação dos pigmentos do camarão, e também as conclusões sobre as condições ótimas de obtenção de produtos de melhor qualidade. Essas conclusões são:

a) A refrigeração de 0° a 1°C deverá ser feita imediatamente após a captura do camarão e o armazenamento não deverá ser maior que 25 dias.

b) A congelação de  $-12^{\circ}$  a  $-35^{\circ}\text{C}$  deverá ser feita por exposição de ar frio, salmoura, placas ou gás liquefeito ( $\text{N}_2$ , freon etc.).

c) A formação da melanina deve ser evitada utilizando - agentes redutores e quelantes que inativam a tirosinase.

d) A oxidação pode ser a causa dos maiores danos na liofilização.

e) A ação catalítica do cobre presente na hemocianina através da ação sequestrante do EDTA e ácido cítrico.

## I N T R O D U Ç Ã O

A cada dia que passa, mais clama o mundo inteiro por alimentos nobres, principalmente aqueles ricos de proteínas. As nações economicamente desenvolvidas podem dar-se ao luxo de consumir quantidades além das necessidades diárias de nutrientes da dieta, a ponto de atingir níveis de consumo prejudiciais à própria saúde. As nações menos favorecidas, em busca de todos os meios, os mais variados, que lhe possibilitem o desenvolvimento sócio-econômico, mesmo à custa do próprio sacrifício doméstico, exportam os seus alimentos nobres. Nada mais típico do que o quadro do camarão. Exportam-no o Paquistão, o Chile, toda a América Central do Golfo do México, o Brasil e a Índia.

Para esses países, camarão é sinônimo de divisas; divisas podem possibilitar mais máquinas, mais bens de consumo de necessidade premente, mais saúde, mais educação; em suma, mais desenvolvimento. Justamente onde há desenvolvimento, onde há interesses de produzir para exportar, também há falta de tecnologia, de know-how.

A matéria prima, por vezes excelente, se degrada mercê dos métodos de captura, de preservações a bordo, de industrialização em terra. A qualidade se degrada; os preços se aviltam.

A manutenção da qualidade do camarão recém capturado exige cuidados especiais, pois que fatores intrínsecos contribuem por sua degradação. Tais fatores são vários mas, sem dúvida, aqueles que mais contribuem para o seu aspecto são os seus pigmentos - astaxantina, como pigmento carotenóide natural desejado; melanina, como produto resultante da bioquímica

após captura, adverso ; hemocianina, como produto degradado , que inferioriza a qualidade.

Dos processos tecnológicos mais empregados para a preservação do camarão após-captura, a referência, a congelação e a liofilização , para efeitos de mercados internacionais, são os que mantêm mais próximas às características originais. Procurou-se assim, neste trabalho relacionar as implicações dos processamentos referidos à manutenção dos pigmentos desejáveis do camarão, ao mesmo tempo que, até onde, tais processamentos possam causar condições adversas à colorações normal e apreciada do crustáceo. Objetivou-se portanto, contribuir, em bora modestamente, para o aprimoramento da tecnologia da preservação do camarão, como mais no fator para o desenvolvimento sócio-econômico dos países exportadores. E finalmente, como consequência, promover meios técnico-científicos mais atualizados para o enriquecimento das exportações dos produtos manufaturados.

## CAPÍTULO I

### PIGMENTOS DOS CRUSTÁCEOS

Os pigmentos animais podem ser divididos em duas grandes categorias: aquelas cuja função principal é a de prever coloração exterior ao animal (28) e aqueles que têm pouco significado como cor, mas que desempenham importante função metabólica.

Os carotenoides e a melanina são os constituintes característicos do primeiro grupo; certas porfirinas, (por exemplo, citocromo) são características do segundo grupo. Como sempre sucede nas generalizações, a distinção nítida entre esses dois grupos muitas vezes é imperfeita. Em diversas espécies ou sob varias condições, um pigmento típico pode tornar-se metabolicamente significativa ou vice-versa.

Essas inter-relações das duas funções são frequentemente encontradas nos crustáceos.

Os principais pigmentos encontrados nos camarões e que desempenham um papel importante na sua comercialização são a astaxantina, a melanina e hemocianina (62), sendo o primeiro pigmento, o mais importante devido à sua coloração vermelha que confere aparência desejável ao produto. A melanina é o pigmento que, ao formar-se nos crustáceos, afeta adversamente sua comercialização, da mesma forma que a degradação da hemocianina, também presente, que torna o crustáceo pouco apreciado.

Especificamente, no caso dos camarões, a astaxantina representa um fator de alto interesse comercial, dada a apreciada coloração vermelha. Os camarões se apresentam com diversas colorações nas carapaças, indo do branco, ao pardo, rosado e vermelho.

É interessante notar que o camarão rosado se encontra em águas profundas enquanto que o pardo e o branco são encontrados em águas pouco profundas. A relação que pode haver entre as colorações dessas espécies de crustáceos com o meio ambiente particularmente no que relaciona com os elementos de nutrição me-

recem particular atenção neste trabalho.

Na tabela 1 demonstra-se a preferência comercial do camarão com relação à coloração.

TABELA Nº 1

Comercialização do camarão segundo a coloração (em 1.000 libras-peso)					
Espécie	1.965	1.966	1.966 como porcentagem de % 1965	Parcela de contri- buição do total de espécie capturada	
				1965 - %	1966 %
Pardo	47.665	50.098	105.1	56,4	62.8
Branco	17.062	16.048	94.1	20.2	20.1
Rosa	19.403	13.467	69.4	23.0	16.9
Outros	339	110	32.4	0.4	0.2
TOTAL	84.469	79.723	210.0	100.0	100.0

Tabela extraída de Fieger, A.B. e colab. (28)

## INFLUENCIA DO PLANCTO

(1) No mar existem duas classes de planctos: o fitoplancto que é o plancto vegetal constituído por uma variedade imensa de algas microscópica que servem de alimentos para o zooplancto. O plancto desempenha um papel importante na pigmentação vermelha do camarão, sendo, provavelmente, mais eficaz a ação do zooplancto, já que o crustáceo na fase adulta é carnívoro, sendo sua alimentação a base de animais vivos que contém o pigmento astaxantina na própria constituição.

(2) Segundo Esteven, citado por Goodwin (36) os carotenoides verdadeiros do camarão são de origem alimentar.

Certos crustáceos herbívoros, porém desenvolvem o pigmento astaxantina, o que poderia explicar a probabilidade de síntese metabólica. Para Goodwin (36), certos crustáceos como o Capépodo e Meganyeti-phanes norvegica, cuja alimentação é feita a base de fitoplancto, há patente síntese do pigmento.

(3) Fisher e colab. (32), notaram que nos crustáceos anteriores havia um aumento significativo de astaxantina nos indivíduos adultos, devido à mudança de alimentação de herbívoro à carnívoro. Observou-se nos indivíduos jovens e nos copépodos (que são herbívoros) certas quantidades de astaxantina, o que pode indicar que certos animais podem sintetizar os carotenoides.

O mecanismo de síntese poderia ser explicado através da oxidação do B-caroteno ou seus derivados à astaxantina, como veremos adiante.

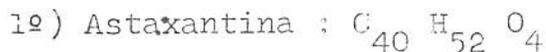
Fox e Hopkin, citado por Thommen (79), investigaram o metabolismo de certos carotenoides nos crustáceos, tentando explicar certas diferenças na degradação e na biooxidação do B-caroteno, segundo diferentes hábitos alimentares. Para Thommen (79) o começo da oxidação do B-caroteno à astaxantina envolve duas principais reações. A figura 1, demonstra o possível caminho da oxidação do B-caroteno na espécie Equinodermata



(4) É portanto, discutível se a formação do pigmento no camarão é devido a hábitos alimentares, ou a uma formação natural ou a ambas. Steven citado por Goodwin (36), demonstrou que no salmão-truta mantido em cativeiro, apresenta sua pigmentação natural quando sua dieta foi feita de Entomostraces (principalmente de Simocephalus e Daphnia) e larva de Coretra\*, porém quando a alimentação foi substituída, observou-se significativa redução da astaxantina.

\* Nota: Coretra: Genero de insetos dípteros, nemóceros, família dos culiciformes. Conhecem-se algumas espécies de coretra dez das quais habitam na Europa. As larvas, transparentes, vivem na água.

#### ASTAXANTINA E O ASTACENO SEM FOR FORMULA BRUTAS:



Os pigmentos dos crustáceos tem despertado interesse de químicos e de zoologistas. Somente há poucos anos foi possível obter-se maiores informações da natureza desses pigmentos e de sua constituição química.

O primeiro pigmento do genero foi isolado em 1933 da carapaça da lagosta, sob a forma de astaceno. Esse pigmento foi mais tarde reconhecido como uma tetracetona-β-caroteno, por Karrer e colab (48).

Alguns anos mais tarde, Kuhn e Sorensen, citados por Ball (7), evidenciaram que o pigmento encontrados nos ovos de lagosta, conhecido como "ovo-éster", não era um ester de astaceno, e sim um novo pigmento ao qual denominaram astaxantina.

Demonstraram ademais que esse pigmento é facilmente convertido a astaceno, em solução alcalina e sob influencia de oxigênio atmosférico. É, portanto, possível que o astaceno seja formado pela saponificação do éster da astaxantina e que a asta--

xantina mesma, seja o pigmento natural dos animais e também das plantas.

#### OCORRENCIA DA ASTAXANTINA E ASTACENOS (48)

Admitia-se que o astaceno e a astaxantina fossem pigmentos típicos dos animais. Pesquisas mais recentes evidenciaram que esses pigmentos estão presentes também nas plantas.

Desde o isolamento do astaceno da lagosta (carapaça, hipoderme, e ovos), numerosas fontes desses carotenoides foram encontrados. O pigmento ocorre na forma esterificada e combinada à proteína. O elemento de ligação da proteína parece ser iônico, a carga positiva situada nela mesma.

#### TABELA 2

##### OCORRENCIA DA ASTAXANTINA OU ASTACENO

- (1) Alga verde : *Haematococcus pluvialis*.
- (2) Crustacea : (a) Malacostraca: *Schizopoda euphausia*  
(b) Decápoda: *Astacus gammarus* (carapaça, hipoderme e ovos), *Cancer pagurus*, *Leander serratus*, *Maja guinaelo*(ovos), *Palinurus vulgaris*.  
(c) Copépodo: *Calanus finmarchianus*<sup>+</sup>, *Heterocopes salien*.  
(d) Arthrostaca: *Gammarus pulex*<sup>+</sup>
- (3) Molusco: *Lima excavata*
- (4) Equidoderma: *Ophidiaster ophidianus*, *Equinaster sepositos*.
- (5) Pescados: *Beryx decadactylus* (peles)<sup>+</sup>, *Carassius auratus* (pele)<sup>+</sup>, *Perca fluviatilis* (barbatana)<sup>+</sup>, *Salmão truta* (músculo)<sup>+</sup> e *Sebastes marinus* (pele)<sup>+</sup>
- (6) Repteis: *Clemmys insculptata* (retina)<sup>+</sup>
- (7) Pássaros: Frango (retina)<sup>+</sup>

Nota: + quer dizer a forma da qual a astaxantina foi

isolada. (nesses casos não se sabe se o pigmento astaceno é natural ou produto de transformação da astaxantina).

A astaxantina pode apresentar-se na natureza sob a forma de ester epifásico, pigmento livre e de proteína complexa (cromo-proteína).

Éster epifásico: *Astacus gammarus* (hipoderme); frango (retina) *Haemotococcus pluvialis*, *Beryx decadactylus* (pele) *Percas pluvialis* (barbatana) e *Sebastes marinus* (pele)

Pigmento livre : *Maja squinado* (ovos), Salmão irídeus (ovos) e Salmão truta.

Proteína complexa: *Astacus gammarus* (carapaça com coloração preto-azulada), *Astacus gammarus* (ovos) de coloração verde (ovoverdina), *Heterocope salien* de coloração azul.

#### ISOLAMENTO DO ASTACENO DA CARAPACA DA LAGOSTA (48)

Carapaças do animal recém morto são cobertas com ácido clorídrico 2N até coloração vermelha. Em seguida, são lavadas com água e, a parte hipodérmica, separada. O pigmento é extraído com acetona à temperatura ambiente e transferido ao éter de petróleo por meio de diluição do extrato com água. A solução do éter de petróleo é lavada com água e com metanol a 90% diluída com hidróxido de sódio 2N e com suficiente etanol até produzir uma solução homogênea. Esta é deixada na obscuridade à temperatura ambiente, por 5 horas. Decorrido esse tempo, adiciona-se água até separação de 2 fases. A camada etanólica é separada e sobreposta por uma fina camada de éter de petróleo, o astaceno é precipitado por acidificação cuidadosa com ácido acético. O pigmento é lavado com água quente, dissolvido em pequena quantidade de piridina altamente purificada e cristalizado pela adição de pequenas quantidades de água.

De 29 animais (12.8 Kg de peso) o rendimento em astaceno 3 vezes cristalizado foi de 0.265g.

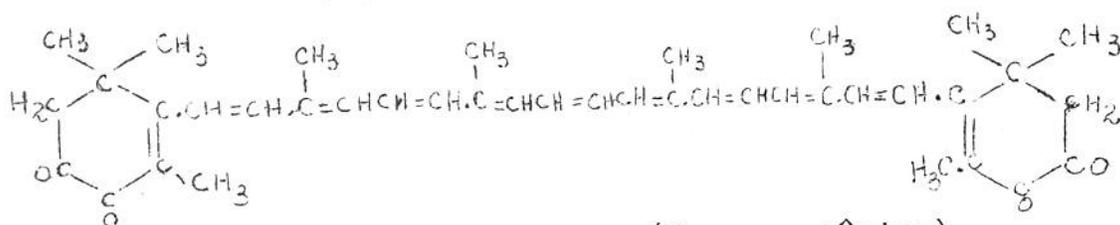
A ASTAXANTINA ISOLADA DO ÔVO DA LAGOSTA

2.5 Kg de ovos da lagosta foram triturados em gral de porcelana com adição de acetona e gôlo sêco. A massa obtida, filtrada e extraída repetidamente com acetona muito fria. O extrato, de coloração vermelho-intenso, é coberto com 1/5 de seu volume, com éter de petróleo e diluído cuidadosamente com um volume de água dístilada (1) Depois da filtração, a solução de éter de petróleo é extraída com metanol a 90% (2) parte do pigmento se separa em belíssimas escamas brilhantes (3) esta é coberta com benzeno recém dístilado e outra parte de astaxantina é precipitada por adição cuidadosa de água. As duas frações são cristalizadas conjuntamente em uma mistura de piridina e água (48). Dos 2.5 Kg. de ovos de lagosta, obteve-se um rendimento de 750 mg. de astaxantina.

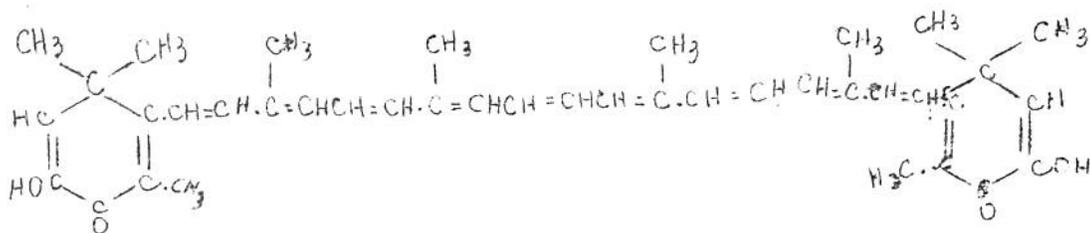
CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ASTACENOS

Pode apresentar-se sob duas formas:

- (a) Cetônica
- (b) Enólica.



Astaceno (forma cetônica)



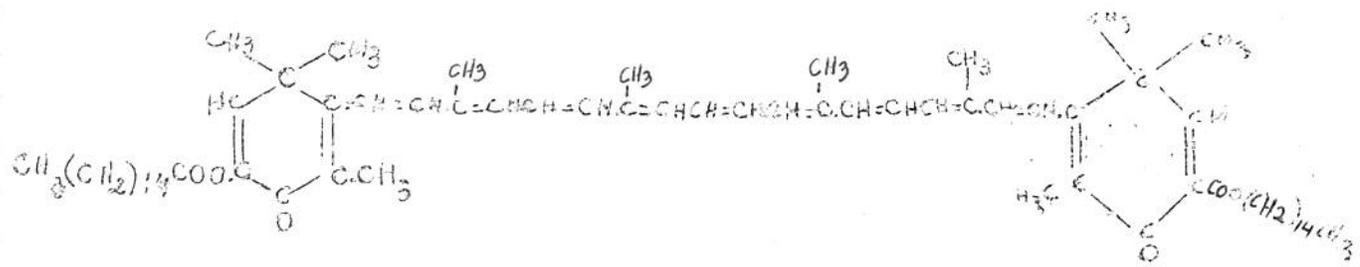
Astaceno (forma enólica)

Segundo Karrer e colab. (48) o astaceno é o 3:3':4:4' - Tetraceto -B-caroteno. A análise elementar desse pigmento dá como fórmula molecular  $C_{40} H_{48} O_4$ , a qual difere do B-caroteno por 8 átomos de hidrogenio a menos e 4 átomos de oxigenio a mais.

O astaceno forma uma dioxima, que contém 4 átomos de hidrogenio ativos, dois destes são derivados de resíduos da oxima, enquanto que os outros dois são devidos a enolização dos outros dois grupos carbonilos. Portanto os quatro grupos cetonicos diferem em natureza, dois sendo capazes de sofrer enolização. O astaceno produz um derivado da bis-fenazina com a orto-fenileno diamina o que demonstra que cada par de grupos carbonilos deve ser adjacente. Karrer e colab. (48), através oxidação do astaceno com permanganato de potassio, obtiveram o ácido dimetilmalônico. A oxidação do derivado bis-fenazina, a ácido dimetilsuccínico, também isolado, estabeleceu a presença do 4º grupo carbonilo nas posições 3:3':4:4'. Isto está de acordo com Willstaedt, citado por Karrer e colab. (48) que o astaceno pode ser reduzido pelo pó de zinco e acido acético em solução de piridina para dar um derivado de cor amarelo brilhante.

A hidrogenação gradativa do astaceno, demonstra a presença de 13 duplas ligações, duas das quais formadas por enolização. O astaceno livre é muito pouco enolizado como se demonstra pela lenta esterificação com diazometano ( $CH_2N_2$ )\* e pela determinação de Zeriwitinoff.

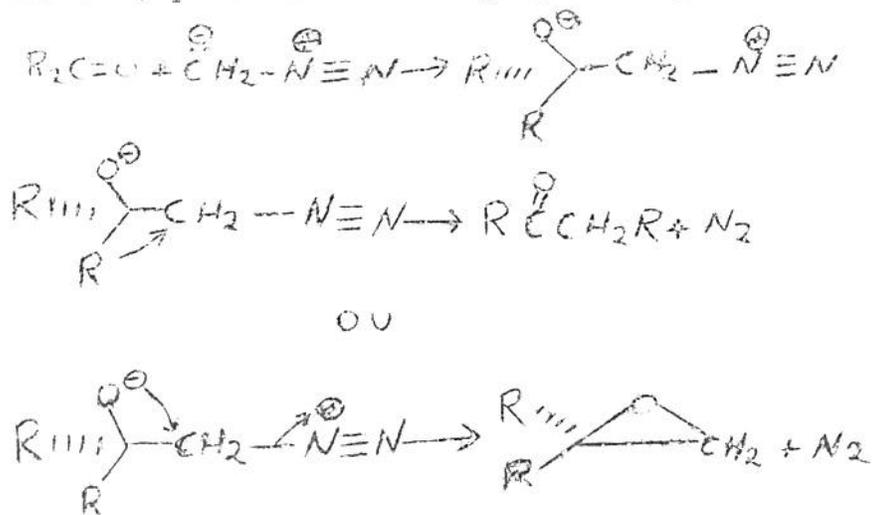
Karrer, Jaewe e Hubner, citados por Karrer e colab. (48), investigaram o ester epifásico do astaceno da lagosta e o descreveram como dipalmitato de astaceno.



Dipalmitato de astaceno

É provável que o composto seja, realmente o ester do ácido dipalmitico da astaxantina.

\* A reação pela qual o astaceno podia esterificar-se com diazometano, possivelmente seja pelo seguinte mecanismo: (12)



Nesta reação, o grupo metileno (CH<sub>2</sub>), se adere ao grupo carbonilo (C=O), o qual pode dar lugar a compostos de cetona ou de epóxidos com separação de nitrogênio (N<sub>2</sub>)

PROPRIEDADES E DERIVADOS DO ASTACENO:

Cristaliza em meio de piridina e água em agulhas de brilho violeta metálico. Ponto de fusão 240-243°C. É insolúvel na água, muito pouco solúvel em éter de petróleo e metanol, pouco solúvel em benzeno, em acetato de etila, e em ácido acético; solúvel em disulfeto de carbono e, facilmente solúvel em cloroformo, em piridina e em dioxano.

Em particular entre éter de petróleo e metanol 90%, a astaceno se encontra quase que inteiramente na camada inferior. Pela adição de pequenas quantidades de H<sub>2</sub>O, o pigmento se transfere rapidamente para o éter de petróleo, mas permanece na camada inferior em presença de alcali.

Nas análises cromatográficas o astaceno é dificilmente absorvido pelo carbonato de calcio. da mistura de benzeno e

NOTA: R pode ser radicais de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> CH<sub>3</sub> CH<sub>2</sub> ou C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

e eter de petroleo. Na coluna de alumina, e com os mesmos sol-  
ventes, se fixa na zona superior do cromatograma. Não é eluido  
da alumina mesmo com benzeno/metanol ou piridina/metanol.

O astaceno apresenta diferentes comprimentos de ondas de  
absorção quando em solventes diversos, tais como piridina e  
disulfeto de carbono. Em piridina apresenta maxima absorção de  
500m $\mu$  e em disulfeto de carbono, ao redor de 510 m $\mu$ .

Soluções concentradas do pigmento em piridina apresentam,  
coloração vermelho-sangue, e em soluções diluidas, vermelho  
alaranjado.

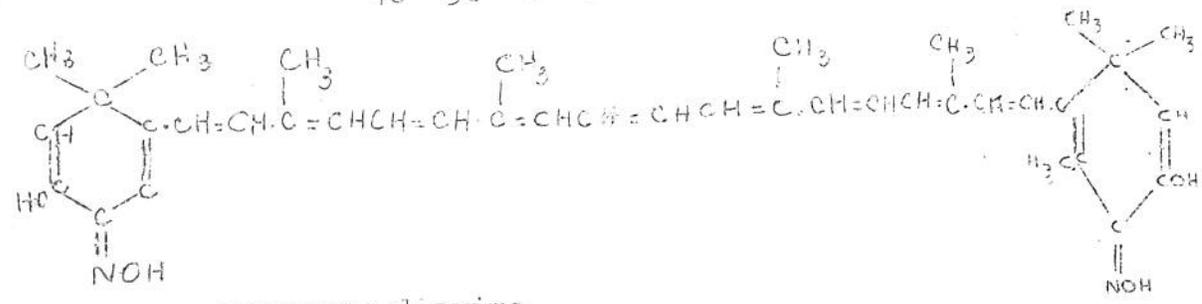
Dissolve-se em ácidos sulfuricos concentrados com uma cor  
azul-escura. O tratamento da solução do pigmento em cloroformo  
com triclorato de antimônio produz uma coloração verde-azulada.  
O astaceno difere dos demais carotenoides pelo seu espectro de  
banda simples e pelo seu comportamento em faces aos alcalinos.

COMPORTAMENTO QUIMICO DO ASTACENO

É muito estável do oxigenio atmosferico. O comportamento  
químico é caracterizado pela capacidade de enlização de dois  
grupos carbonilos e pelas reações cetônicas dos outros 2 grupos  
carbonílicos (>C=O)

Os derivados mais importantes deste pigmento são os se-  
guintes:

a) astaceno dioxima C<sub>40</sub> H<sub>50</sub> O<sub>4</sub> N<sub>2</sub>



astaceno dioxima

b) Derivados bis-fenazina C<sub>52</sub> H<sub>56</sub> N<sub>4</sub> Este composto foi obtido  
por Karrer e colab. (78) pelo aquecimento de uma solução de as-  
taceno com orto-fenileno diamina em ácido acético glacial du-

15

rante 1 hora e meia em banho maria. Depois se separa em solução de benzeno, sob forma de cristais de cor violeta intensa. Como não pode ser enolizado, produz ácido ~~X:X~~ - dimetil-sucínico por oxidação com permanganato com um ponto de fusão de 224-225°C. Banda de absorção, máxima cerca de 513 m $\mu$  em di-sulfeto de carbono.

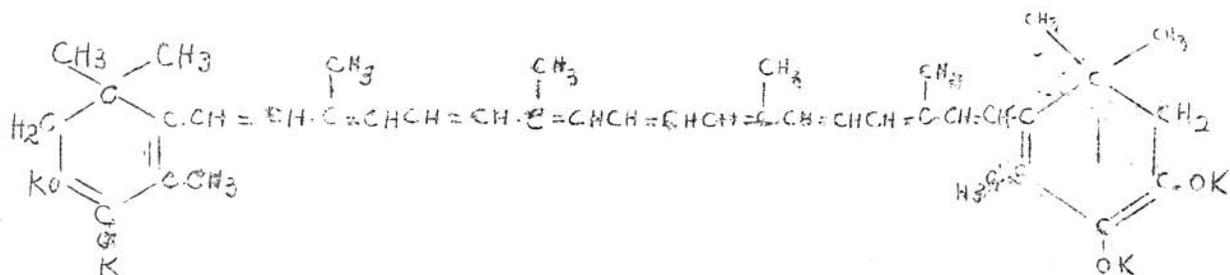
c) Diacetato de astaceno C<sub>44</sub>H<sub>52</sub>O<sub>6</sub>, outro derivado do astaceno obtido através da reação do astaceno em piridina, com o anidrido acético durante 16 horas. O composto se cristaliza em cristais violeta-escuro em piridina e água, tem um ponto de fusão de 235°C (não corrigido e com decomposição).

d) Dipalmitato de astaceno C<sub>72</sub>H<sub>108</sub>O<sub>6</sub> (astaceino). Foi demonstrado por Karrer e colab. (48), que o astaceno (ou astaxantina) esterificada ocorre na lagosta com ácido palmítico. Kuhn e colab., citado por Karrer e colab. (48), prepararam depalmitato de astaceno a partir de astaceno e do cloreto de ácido palmítico. O dipalmitato de astaceno cristaliza em presença de eter de petroleo em folha regular, vermelha. Esse composto exhibe propriedades epifásicas.

#### ASTAXANTINA

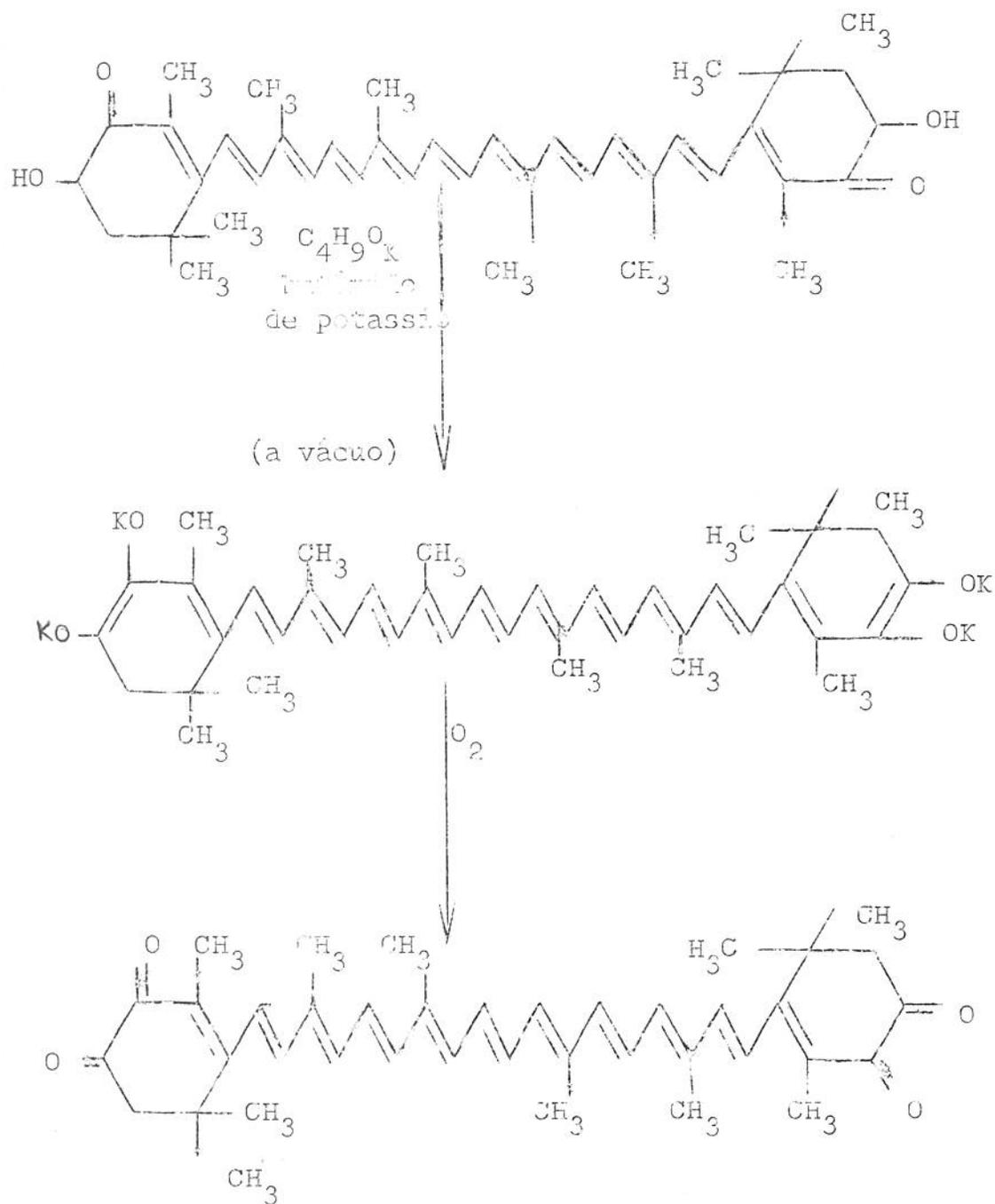
Kuhn e Lederer citados por Karrer e colab. (48), isolaram o "ovo-ester" cristalino dos ovos da lagosta; mais tarde ficou constatado que o ovo-ester não era um ester e sim uma fitoxantina livre, à qual deram o nome de astaxantina e tem a fórmula molecular de C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>. Tendo analogia com a fórmula do astaceno estabelecida por Karrer e colab. (48). Kuhn e Sorensem, citados pelo mesmo autor lhe deram a estrutura de <sup>um</sup> 3,3'-di-hidroxi-4:4' - diceto -B-caroteno ao pigmento astaxantina. Sugere tal formulação o fato de que, em ausencia de ar, a astaxantina forma sal de coloração azul intensa em solução de hidróxido de potássio, enquanto que em condições aeróbicas, o pigmento absorve exatamente 2 moles de oxigênio em solução alcalina e se conver

te em astaceno. A conversão da astaxantina a astaceno representa a auto-oxidação de um di-~~o~~-cetoí. Em concordância com a formulação do pigmento, os di-esteres podem ser preparados como dipalmitato de astaceno. De acordo a Kuhn e Sorensen, citados por Karrer e colab. (48) o sal de potássio de coloração azul intenso da astaxantina pode ser comparado ao sal de potássio de cor alaranjado, de benzoína e aos correspondentes sais do ester-dimetil-dehidrocrocetina e ester dimetil-dihidrobixina e pode ser formulado como se segue:



Sal de potássio de astaxantina  
(sal escuro)

Esse composto de sal de potássio da astaxantina, se obtém, quando a astaxantina interage com o butóxido de potássio em vácuo para formar um sal enólico de azul purpura, que ao entrar em contato com o oxigênio atmosférico, é quase instantaneamente convertido em astaceno de cor alaranjada (37). A reação pela qual se leva a cabo esta transformação da astaxantina em presença de butóxido de potássio se apresenta na página seguinte:



ASTACENO

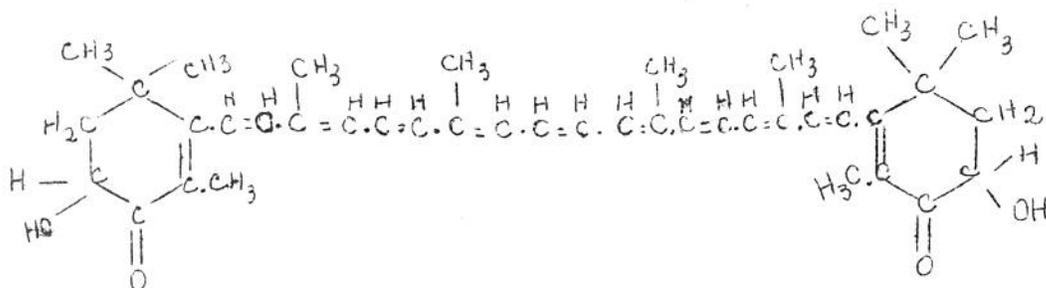
(3:3':4:4'-Tetraceto-B-Caroteno).

Fig. 3 Reação da astaxantina com o butoxi  
do de potássio.

Extraída de Goodwin e colab. (37).

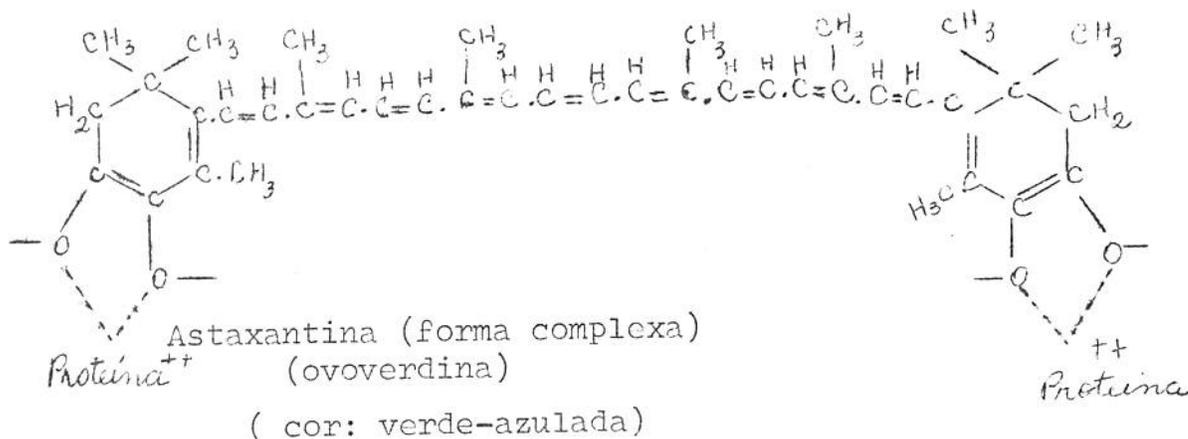
ESTRUTURA DA ASTAXANTINA

A astaxantina pode apresentar-se na natureza animal sob duas formas: (a) livre e (b) complexa ou conjugada. Na forma livre a astaxantina não se encontra ligada a proteína, como se observa na figura abaixo.



Astaxantina (forma livre).

A estrutura da astaxantina complexa ou conjugada é aquela na qual o pigmento está ligado a uma proteína, que se admite seja uma albumina. Esta proteína complexa, segundo Kuhn e Lederer, citados por Karrer e colab. (48), foi denominada "ovoverdina" e é o pigmento natural da carapaça da lagosta. Segundo Kuhn e Sorensen, citados pelo mesmo autor acima (48), a ovoverdina é um sal enólico semelhante ao derivado de potássio de benzoina e astaxantina. A disposição estrutural poderia explicar a cor verde azulada do composto.



É surpreendente que a ovoverdina não é autoxidável em contraste com o sal de potássio da astaxantina, pois segundo Kuhn e Sorensen, citados por Karrer e colab. (48), este fato, que é explicado admitindo-se que a interação do pigmento com a proteína, não seja uma simples união iônica, porém sem resultado de uma combinação estável do pigmento com a proteína, na forma de um complexo molecular. A natureza das forças de ligação não está bem especificada mas um complexo derivado de uma molécula de proteína com dois pontos separados de fixação parece ser o caso, em vez de 2 moléculas independentes de proteínas.

Segundo Stern e colab. (77), a proteína unida ao pigmento é estável na faixa de pH 4 a 8, que seu ponto isoelétrico está a <sup>pH 7</sup> que seu banda de absorção é de 570 e 460 mμ e que seu peso molecular é de  $300 \times 10^3$ . Para Stern e colab. (77) o componente proteico da ovoverdina tem caráter de albumina.

É muito provável que a natureza do componente proteico complexo (ovoverdina) é diferente em distintos organismos. As características comuns de todas as cromoproteínas são: de coloração verde ou azul, solubilidade em água, grande sensibilidade ao calor, aos ácidos e solventes orgânicos (com exceção do éter de petróleo). A proteína do complexo é desnaturada por estes reagentes liberando o pigmento astaxantina. Estas reações, estão expostas na fig. 4, pág. 20.

#### PROPRIEDADES E DERIVADOS DA ASTAXANTINA

A astaxantina é um pigmento que cristaliza em piridina sob formas de lamelas brilhantes. Ponto de fusão de 216°C com decomposição, é facilmente solúvel em piridina, de cuja solução pode ser cristalizada pela adição de água.

A astaxantina, ao contrário do astaceno, exibe curva de absorção com 3 máximos definidos. Em piridina estes máximos estão localizados a 476, 493 e 513 mμ. É opticamente inativa. Na tabela seguinte apresentam-se diferentes longitudes de ondas em diversos solventes.

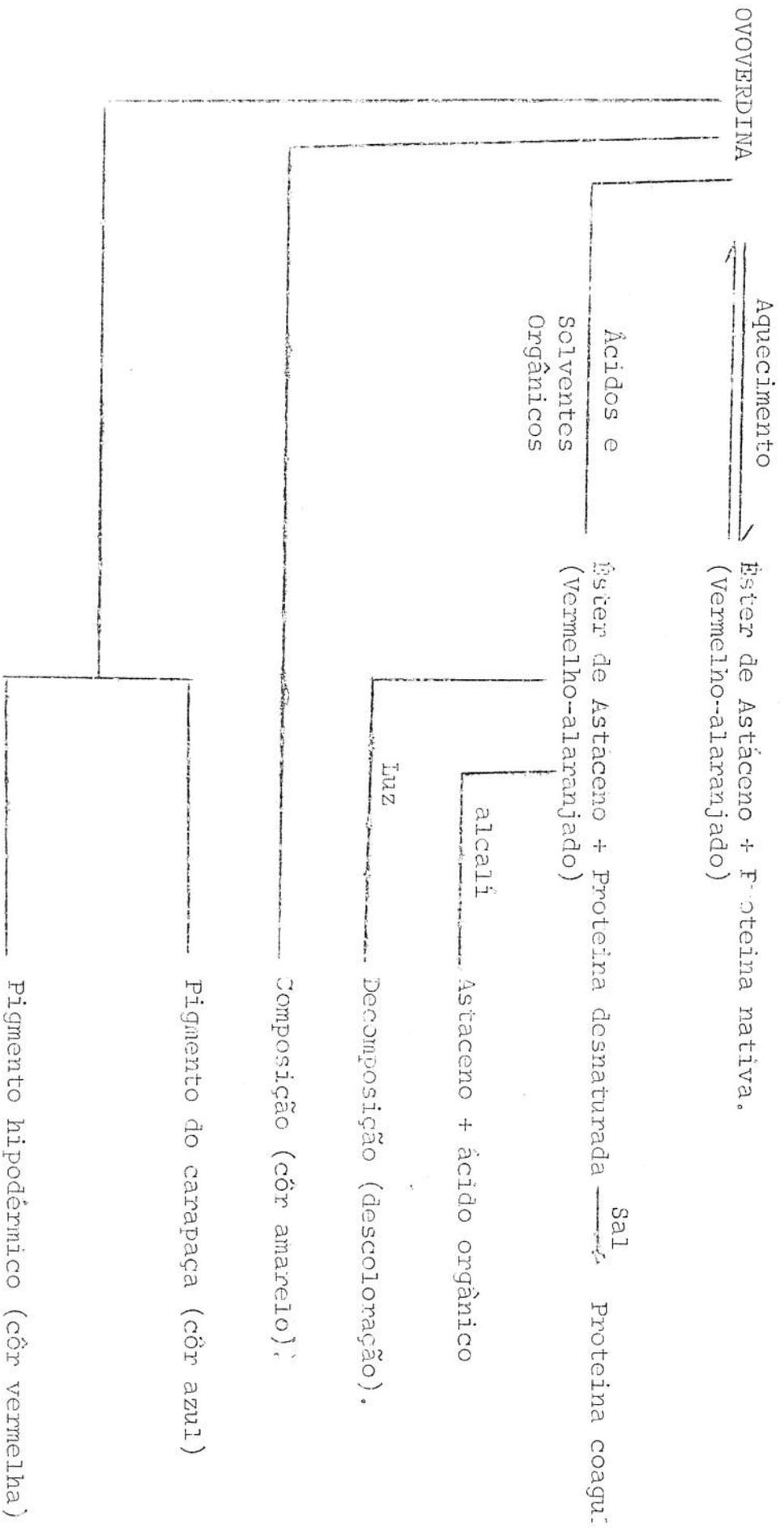


Figura 4 - Características da ovoverdina.  
Extraída de Deuel (21)

Solvente	Absorção máxima (m $\mu$ )	
	Astaxantina livre	Astaxantina conjugada
Hexano	470	467 - 468
Petróleo brilhante	470	_____*
Piridina	490 - 491	488
Disulfeto de carbono	505 - 506	503
Ácido acético glacial	483 - 485	481 - 482
Acetona	475	_____*

Nota: O asterístico significa dado não verificado

Tabela nº 3 .- Absorção máxima da forma livre e conjugada de Astaxantina .

Extraído de: T.W.Goodwin e Col (38)

Kuhn e colab. citados por Karrer e colab. (49) cromatografaram a astaxantina presente na cana de açúcar, utilizando a mistura do benzeno-eter de petróleo (1:4). O benzeno foi usado para a eluição.

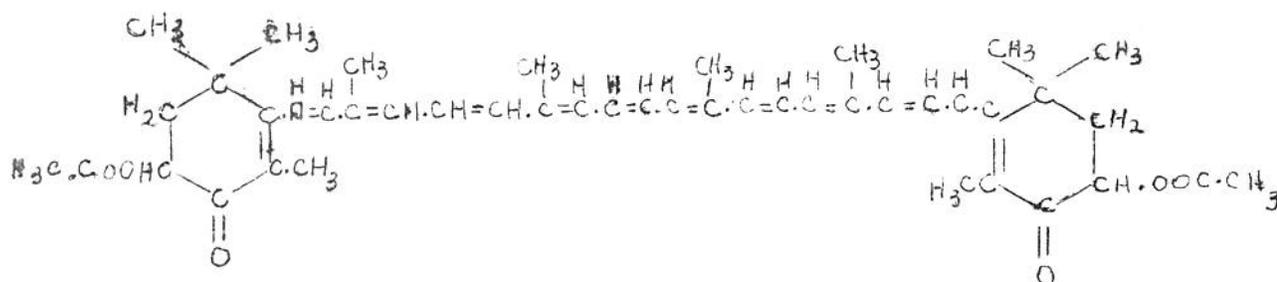
Os sais alcalinos tem uma cor azul profundo, características que somente é exibida, se o ar é excluído. Em presença de oxigênio, há uma imediata mudança de cor passando ao vermelho, ao mesmo tempo que ocorre uma desidrogenação do astaceno.

Desta forma a astaxantina pode ser facilmente identificada por suas reações de cor.

DIACETATO DE ASTAXANTINA.  $C_{40}H_{56}O_6$

Este composto é obtido pelo tratamento da astaxantina dissolvida em piridina com o anidrido acético. O ester cristaliza em uma mistura de piridina e água sob forma de agulha de cor negro-azulado. Ponto de fusão de 203-205°C (Berl-Block, em vácuo não corrigido). O ester é muito pouco enolizado a frio. Nos testes de partição, encontra-se na camada superior. A absorção máxima é localizada pouco acima da banda do pigmento de origem.

A estrutura do diacetato de astaxantina é a seguinte:



DICAPRILATO DE ASTAXANTINA  $C_{56}H_{70}O_6$

Esse ester é preparado pelo tratamento da astaxantina em piridina com cloreto de ácido caprílico. Pode ser purificado -

por cromatografia sobre carbonato de calcio, a partir da solução de eter de petroleo. O dicaprilato de astaxantina cristaliza em solução de eter de petroleo e etanol sob forma de cristais vermelho-escuros, com ponto de fusão de 121-124°C ( não bem definido, em vácuo). Nos testes de participação com metanol a 90% e eter de petroleo, o ester é encontrado quase que quantitativamente na camada superior. O ester se torna hipofásico somente com metanol em concentração de 97%.

DIPALMITATO DE ASTAXANTINA  $C_{72}H_{112}O_6$

Este composto é preparado por um procedimento análogo ao descrito anteriormente para o dicaprilato de astaxantina. É cristalizado em mistura de piridina, metanol e água, em forma de agulhas chatas de coloração vermelho-violeta, com ponto de fusão de 71.5 - 72.5°C.. O dipalmitato de astaxantina exibe comportamento puramente epifásico.

E finalmente, o monopalmitato de astaxantina, obtido através da esterificação da astaxantina com cloreto de ácido palmítico em quantidade calculada. O monopalmitato de astaxantina cristaliza em solução de benzeno, metanol, em forma esferica, de cor vermelha, com ponto de fusão de 113.5 - 114.5°C (corrigida). O composto apresenta propriedade totalmente epifásica com partição entre metanol a 90% e eter de petroleo.

#### INFLUÊNCIA BIOQUÍMICA DA ASTAXANTINA

Massonett, citado por Establier (25), afirma que os peixes podem efetuar a biossíntese da vitamina A, a partir de carotenoides oxigenados, já que ficou provado experimentalmente que a "Gambusia halbrooki" transforma a astaxantina em vitamina A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>. (25).\*

A utilização da astaxantina como precursor da vitamina A parece estar comprovada para as espécies de Merluccios vulgaris, salmão truta e irideus. A vitamina A, foi encontrada em

pássaros, em pescados, em moluscos e crustáceos. Na lagosta, a vitamina A foi encontrada nos olhos.

Neiland, citado por Fisher e colab. (32) investigaram a conversão de caroteno em vitamina A, na lagosta, *Homarus americanus* e acharam concentrações de 36 U.I./gr no hepatopâncreas, 100 U.I./g nos olhos, numa dieta isentas de carotenos; e 53U.I./gr. no hepatopancreas e 183 U.I./gr nos olhos, quando a dieta foi suplementada com B-caroteno. Em diversos crustaceos a presença de vitamina A preformada pode indicar ser ela proveniente de síntese a partir de carotenoides, bem como prover de hábitos alimentares.

#### INFLUENCIA HORMONAL:.

Sabe-se desde muito tempo que as fêmeas de alguns crustáceos acumulam pigmentos carotenoides quando se aproxima a maturação sexual (25). Assim Abelvas e colab. citados por Establier (25) comprovaram que a fêmea do "*Carcinus maenas*" transfere as reservas de carotenoides acumulados no hepatopâncreas aos ovários, através do sangue, permanecendo apenas traços de pigmentos nos hepatopâncreas e sangue.

Também Green, citado pelo mesmo autor (25), observou que havia uma migração de caroteno-proteína do sangue aos ovários do crustáceo *Daphnia*.

Goodwin e colab. (38) verificaram que a fêmea do *Tigriopus fulvus* contém, em seu ovário, cerca de 50% do total de carotenoides. Esta mobilização de astaxantina até os ovários dos crustáceos parece indicar que tenham um certo papel na reprodução ou embriogênese, fato ainda não demonstrado completamente.

COMPORTAMENTO DA ASTAXANTINA FACE AOS PROCESSOS USUAIS DE PRESERVAÇÃO DO CAMARÃO.

Luna (55) conduzindo estudos sobre a decomposição do camarão (*penaeus brasiliense*) observou que os crustáceos perdiam sua coloração vermelha quando foi armazenado a diferentes temperaturas (25, 5 e 0°C), sendo maior sua perda a 24 e 5°C, que 0°C e esta diminuição aumentava em função do tempo (ver gráfico seguinte).

Em estudos sobre carotenóides encontrou-se que eles são estáveis ao calor num sistema com um conteúdo mínimo de oxigênio e que em soluções de óleos e sob atmosfera de nitrogênio, os carotenóides podem ser aquecidos até 150°C com perdas pequenas, porém quando o B-caroteno é aquecido em solução cerca de 60°C, produz-se em sua estrutura uma isomerização da forma trans a cis, com descoloração do pigmento (11).

Os carotenóides são estáveis entre uma faixa de pH de 2 a 7 em alimentos exceto para aqueles que tem em sua estrutura grupos carbonilos como a bixina que muda de cor e solubilidade ao variar o pH enquanto que o B-caroteno e astaxantina não mudam de coloração ao mudar o pH, sendo estáveis a pH 2-7. Luna (55), estudando o pigmento astaxantina do camarão, explica que o pH não pode ser tomado como uma fator responsável da descoloração do carotenoide. Na tabela 4, 5 e 6 se observa que a um aumento de pH no crustáceo a qualidade organoléptica do mesmo se torna indesejável.

Astaxantina, em contato com o oxigênio perde gradativamente a intensidade de sua coloração. Goodwin e colab. (37), observaram que o pigmento em presença de butóxido de potássio, forma um composto intermediário (azul intenso) que ao interagir, com o oxigênio é oxidado a astaceno (vide página 19). Simon e col. (33), encontraram, que a perda da astaxantina no crustáceo, era devida à presença de oxigênio no sistema, e que esta descolora

ção aumenta em função do tempo. (Vide fig. 6).

A astaxantina, também é oxidada pelos raios visíveis e ultravioletas. Dewel (21), diz, que a degradação do pigmento é mais efetiva pelos raios visíveis que o ultravioleta, sendo esta perda mais rápida, se dentro do sistema (refrigeração, congelação e liofilização) o  $O_2$  está presente.

Amano e colab. (2) investigaram, que peixes de pele vermelha eram degradados por longitudes de ondas de 330 a 380 mu. (luz ultravioletas).







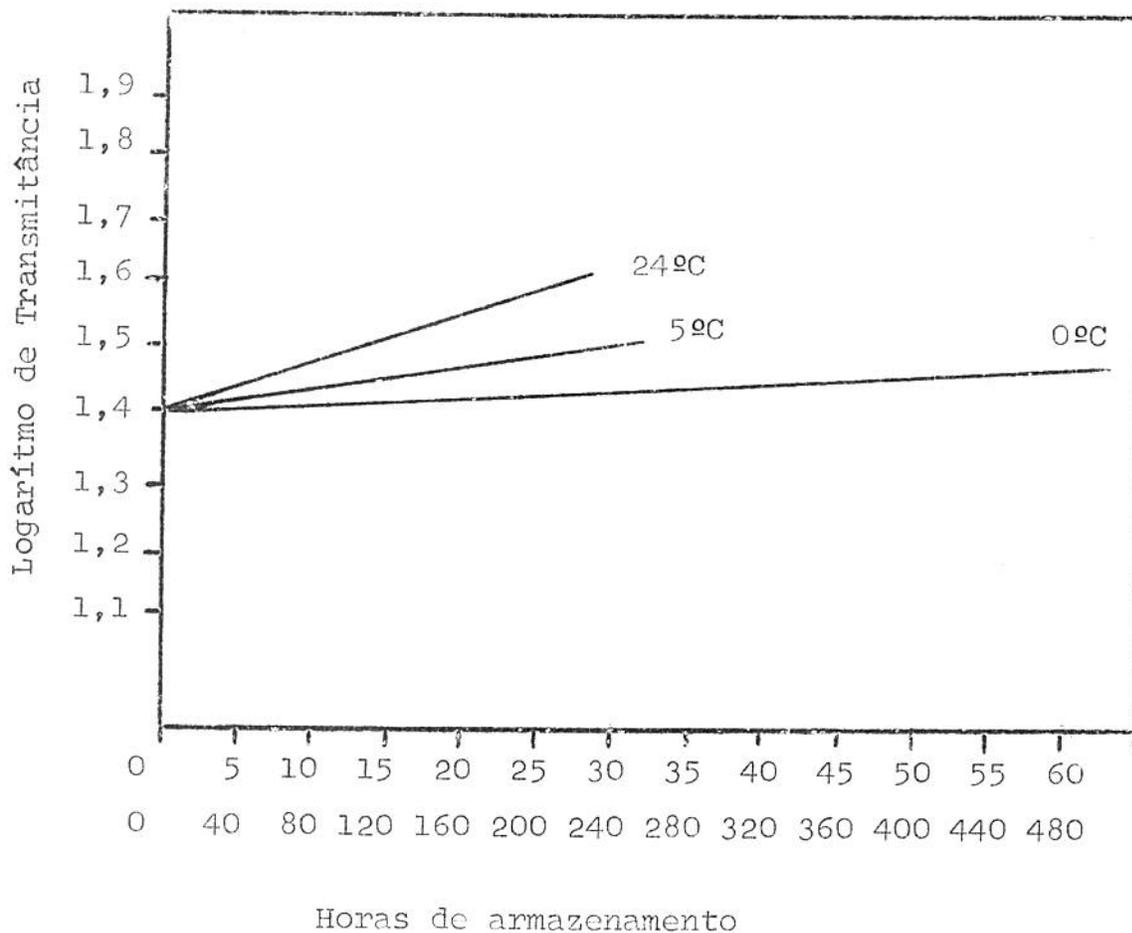


Figura 5 - Variação da coloração do camarão a 24°C, 5°C e 0°C, em função do tempo de armazenamento.

Extraído de: Luna (55)

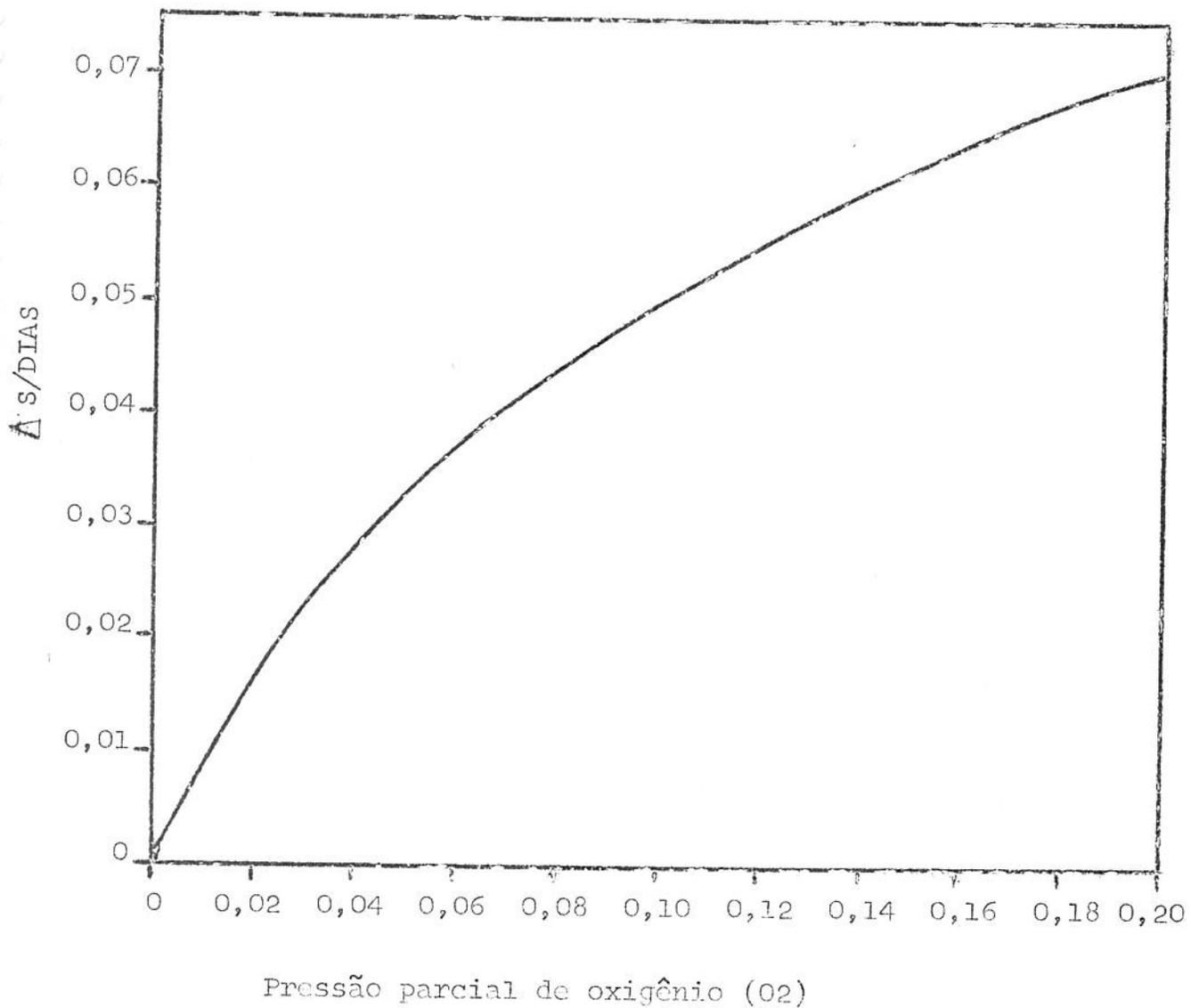


Figura 6 - Velocidade de perda de carotenoide em função da pressão parcial de oxigênio.

Extraído de: Simón e col (73)

## OXIDAÇÃO DAS GORDURAS

Segundo Tarr citado por Faulkner (26), o desenvolvimento da rancificação da gordura do salmão é seguida de uma descoloração do pigmento astaxantina e que esta degradação é semelhante a que ocorre quando o B-caroteno é oxidado. É que esta oxidação das gorduras dá lugar a uma formação de peróxidos e hidroperóxidos que ao reagir com o caroteno é simultaneamente oxidado e branqueado (78)

Segundo Tookey e colab. (80) a destruição do B-caroteno pela enzima lipoxidase é maior se sua concentração é alta.

Segundo Faulkner (26), em um estudo dos pigmentos do camarão, a perda da astaxantina se deve a oxidação das gorduras devido ao fato de que o uso de anti-oxidante reduz a descoloração nos crustáceos (ver tabela seguinte).

Esta oxidação de gordura insaturada no camarão pode ser incrementada pela temperatura, luz, oxigênio e pro-oxidante (sais, metais, etc.)

A formação dos peróxidos e hidroperóxidos, na degradação das gorduras é que possivelmente reagem com as duplas ligações (-C = C-) da astaxantina com produção de epóxidos.

Segundo Nicoava, citado por Codea (17), o mecanismo pelo qual o caroteno é oxidado por radicais peróxidos ou hidroperóxido é o apresentado a seguir.

No esquema seguinte, o mecanismo provável pelo qual o caroteno é degradado.

TABELA Nº 7

Perdas de pigmentos depois de 10 meses do camarão congelado, tratado com vários agentes anti-oxidantes.

Número de Experimentos	Tratamentos Contrôle	Perda de Pigmentos %
1	Contrôle	20,4
	Ácido ascórbico	4,6
2	Contrôle	36,9
	Ácido ascórbico	25,4
3	Contrôle	25,9
	Ácido ascórbico	1,4
	NaCl ( 2% )	18,6
	Ácido ascórbico +NaCl	2,6
4	Contrôle	23,8
	Ácido ascórbico	2,7
	BHA ( 0,02% )	16,2
5	Contrôle	40,7
	Ácido ascórbico	26,0
	Defumação (0,15%)	24,8
	Ácido ascórbico + defumação	0,0

Nota: A concentração de ácido ascórbico foi de 0,1% em todos os experimentos.

Extraídos de: Faulkner e Col. (26)

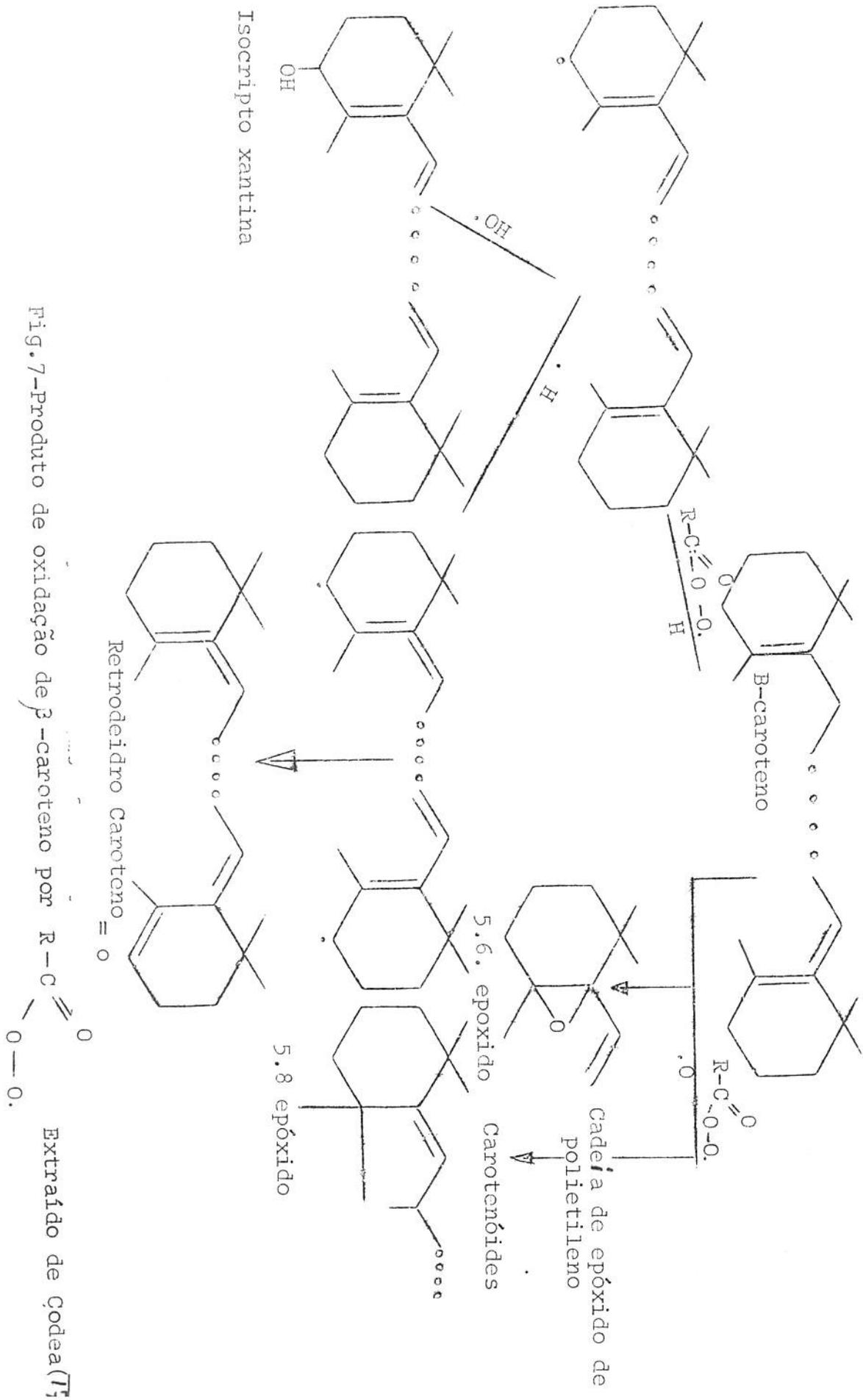


Fig.7-Produto de oxidação de  $\beta$ -caroteno por R-C(=O)-O-O·

Através do segundo mecanismo de inibição consistindo na interação do peróxido com a dupla ligação do carotenóide, forma um 5,6- epóxido, que o meio ácido resultando na formação de 5.8 epóxido. Isto significa que os carotenóides também podem ser convertidos em 5,6 epóxido in natura, por processos de autoxidação tomando lugar na presença de carotenóides (17).

e) Karel e col (49) estudaram as perdas de astaceno a) liofilização do camarão e do salmão e durante seu armazenamento. A preservação do carotenóide foi estudada em função de temperatura de liofilização b) temperatura de armazenamento em ausência e presença de oxigênio. Na figura 9 evidencia-se o efeito das temperaturas de placa sobre as perdas do astaceno, em crustáceo e salmão. Estes foram liofilizados a temperaturas de 125°F (52.2°C) e 175°F (79,7°C) e armazenados em pacotes contendo oxigênio, se manteve melhor à temperatura de 125°F, no entanto, a diferença dos teores do pigmento diminuiu durante o armazenamento. As perdas maiores a 175°F, possivelmente se devem a uma desnaturação da proteína ligada ao pigmento, menos estável ao calor.

As figuras 8 e 9 demonstram a perda do pigmento em salmão e camarão em atmosfera de nitrogênio e de ar. Estes foram armazenados à 68 e 98°F. O pigmento do camarão armazenado em atmosfera de ar apresentou-se completamente oxidado, ou descorado, depois de uma semana; porém, em atmosfera de nitrogênio reteve-se o pigmento tanto melhor quanto mais inerte o meio. A quantidade de oxigênio, no interior das latas de conservas pode variar de 0,1 a 1%. O pigmento do salmão mostrou-se completamente estável em atmosfera de nitrogênio a 0°F (-17°C) Quando armazenado a 68 e 98°F (20 a 34°C) o dano sofrido pelo carotenóide do salmão é verificado para o crustáceo. Simon e col (73) estudavam a perda da astaxantina no camarão em função da concentração de oxigênio (O<sub>2</sub>) durante o armazenamento. Verificaram que a deterioração aumenta diretamente com a porcentagem de oxigênio. Essa relação vê-se na fig. nº 10.

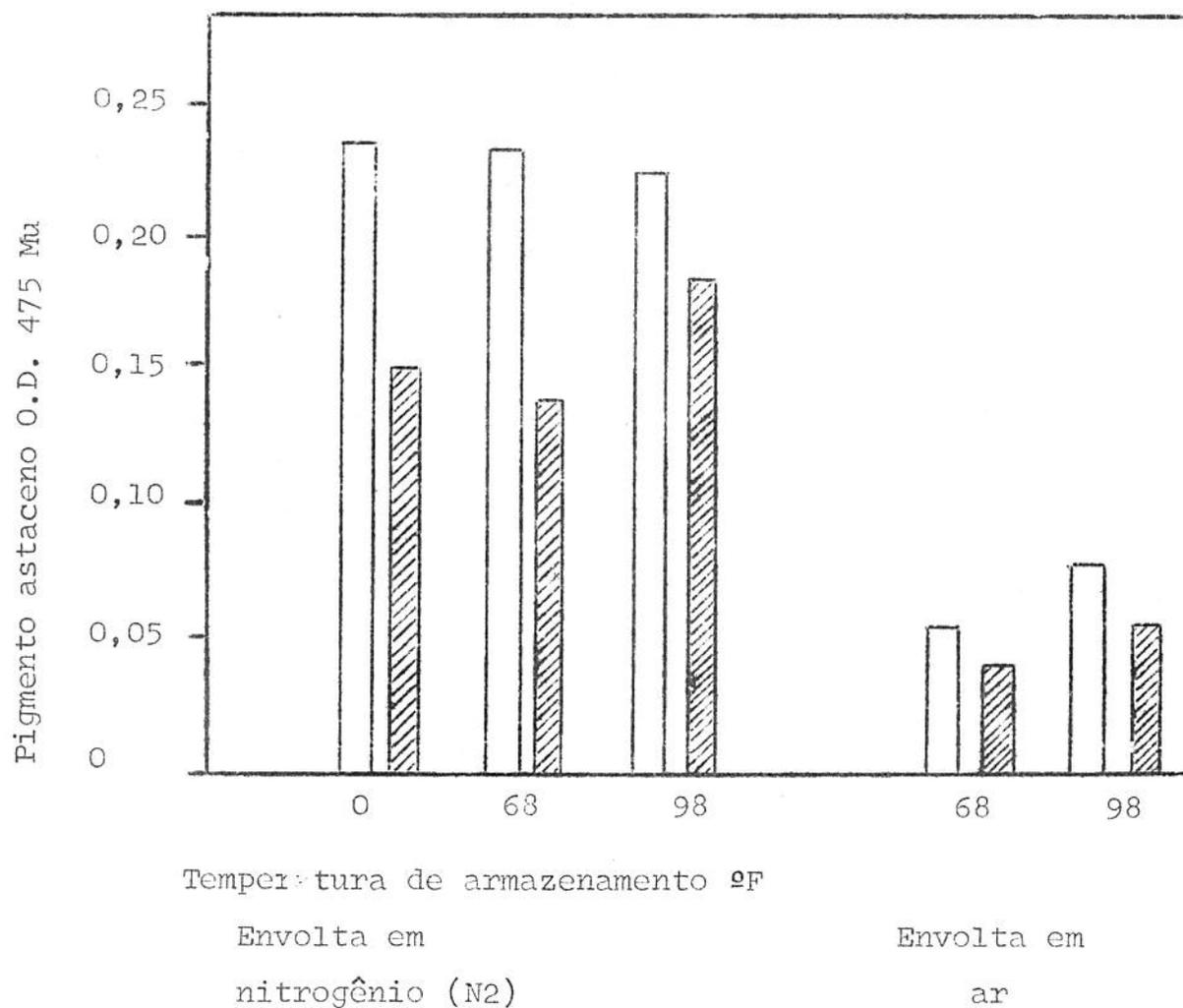


Figura 8 - Pigmento astaceno em camarão liofilizado a 125 F (52,4C)

-  - pigmento no camarão armazenado uma semana
-  - pigmento no camarão armazenado 18 semanas

Extraído de : Karel y Col (49)

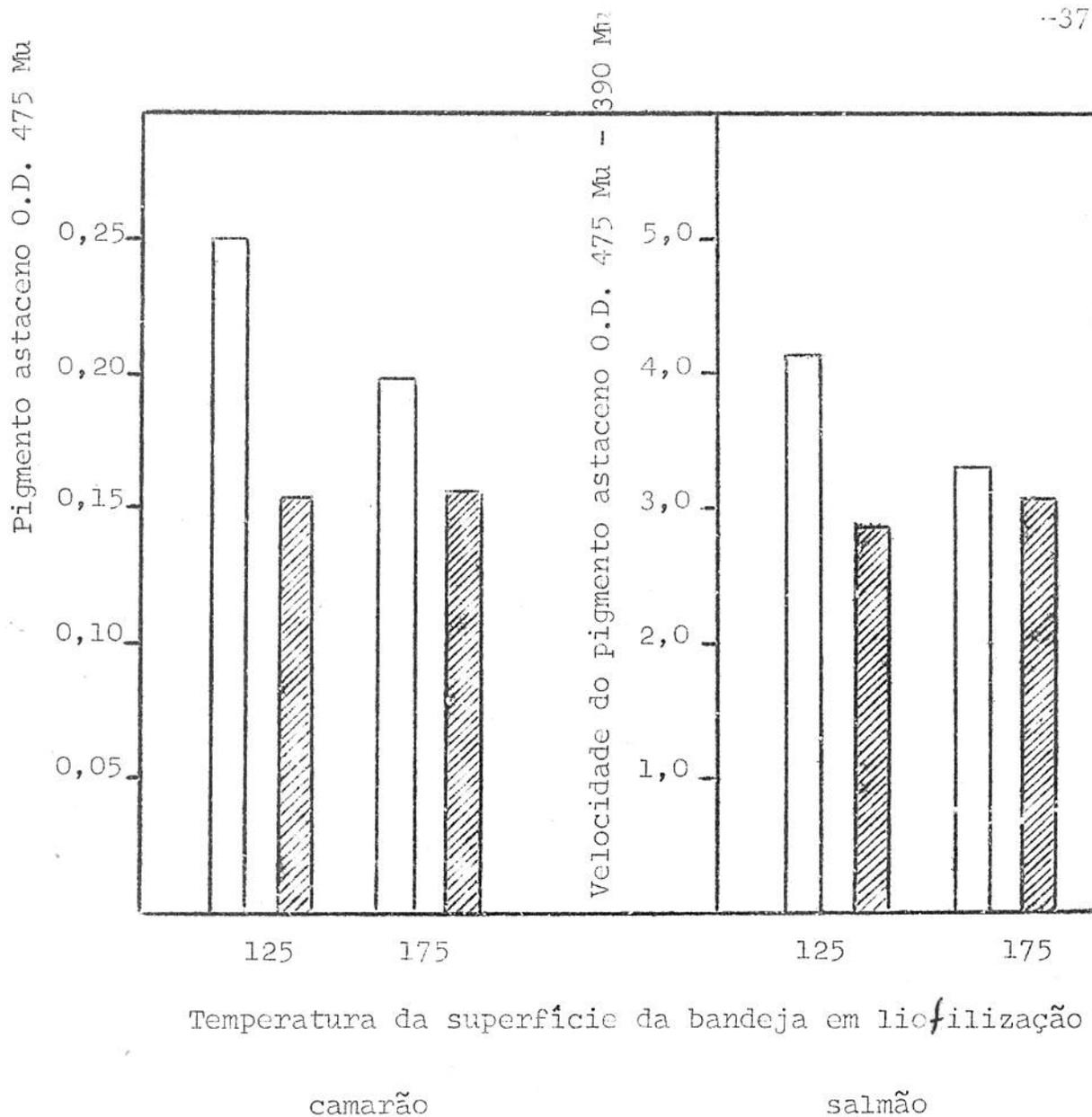


Figura 9 - Pigmento astaceno em camarão e salmão liofilizados e em embalagem com nitrogênio e armazenados a 68 F (20°C)

-  : armazenados por uma semana
-  : armazenados por 18 semanas

Extraído de Karel e Col (49)

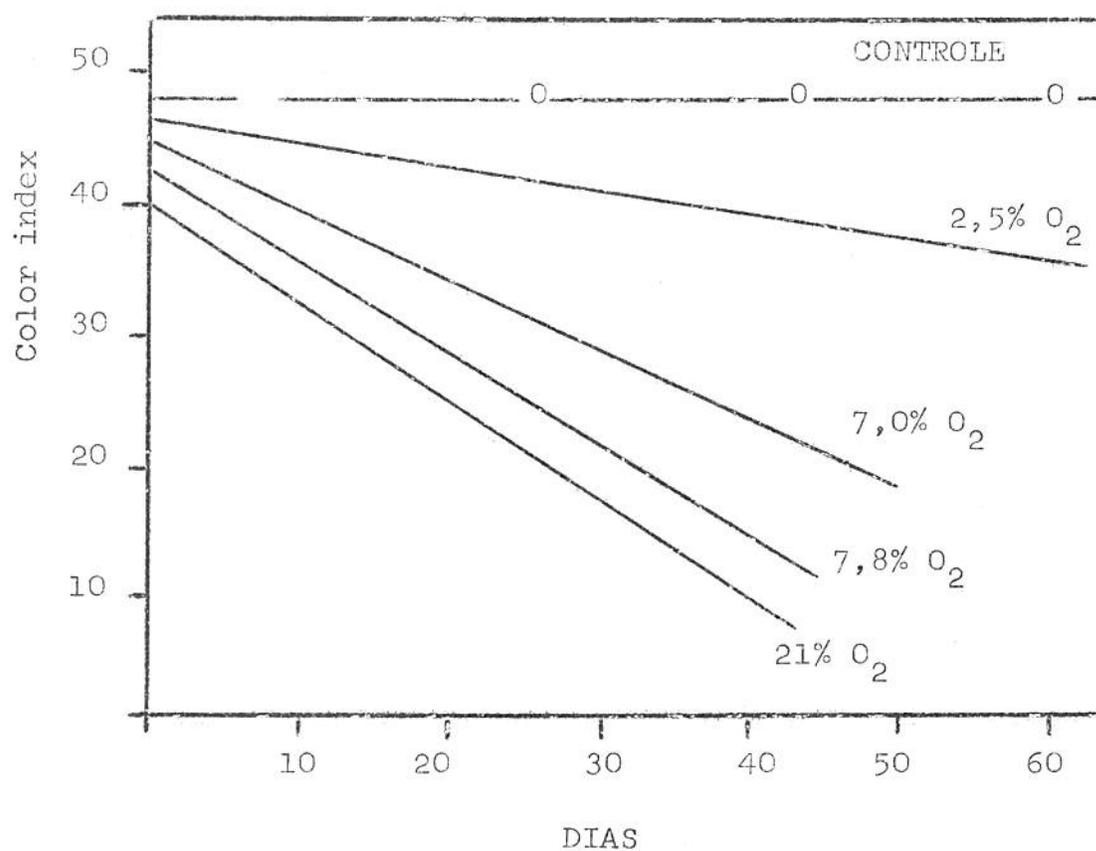


Figura 10 - Perda do pigmento carotenóide (astaxantina) em função da concentração de oxigênio (O<sub>2</sub>)

Extraído de: Simón e Col (73)

## MELANINA

A melanina é um termo generico que inclui um grupo de compostos químicos mal definidos, produzidos por vertebrados, insetos, animais marinhos e plantas. A coloração pode variar de negro a pardo, podendo tais pigmentos serem extraídos dos tecidos por meio de solução alcalina a quente. Foi sugerido por Lerner e colab (52), que a melanina é provavelmente, indolquinona polimerizada, formada pela ação da enzima tirosinase sobre o aminoácido aromático tirosina.

A produção deste pigmento (melanina) nos crustáceos, implica grandes problemas, pois sua formação no produto prejudica a sua aparência e consequentemente sua comercialização.

### DISTRIBUIÇÃO

A melanina encontra-se na retina, no corpo ciliar, no córioide (membrana conjuntiva do olho, entre a esclerótica e a retina), na massa cinzenta do cérebro e na medula adrenal do homem (83). Também encontra-se nos gatos de pele negras, nos cabelos do homem, nas escamas de muitos peixes, nas penas do merlo, em baratas pretas e em certas plantas, tais como: pera, maçã batata e cogumelo. Nos invertebrados a melanina pode estar presente na superfície de alguns vasos sanguíneos como também em alguns gastrópodos e moluscos.

A melanina apresenta-se sob a forma de grânulos do tamanho de 1 µ ou menor. Esses granulos de melanina estão contidos em células chamadas cromatóforos. Em animais sanguíneos, os cromatóforos estão distribuídos em divisões de células chamadas melanóforos. Esses melanóforos, foram encontrados recentemente em pigmentos pretos que se encontram na pele de peixes, como também na tinta de cefalópodos. A melanina nos melanóforos, pode estar dispersada em ramificações ou disseminada no meio celular, desenvolvendo desta forma a coloração negra nos animais.

A mudança de cor da melanina em mamíferos e pássaros é

lenta devido a que as células que contém o pigmento são muito pequenas, pelo que recebem o nome de melanocitos. Estes melanocitos estão bastante ramificados nas células. Atualmente é desconhecido se os grânulos de melanina se movem nos melanocitos. Os melanóforos e melanocitos são usualmente observados - em animais vertebrados e estão situados no sistema embriônico nervoso, de onde emigram ao melanoblasto (33).

#### CAUSAS DA FORMAÇÃO DA MELANINA

Segundo Lerner (53), a formação da melanina é tão conhecida quanto outros processos metabólicos. A melanocitos e a enzima responsável da produção do pigmento preto nos animais se encontram nas células, como também o substrato. Os mecanismos de reação que envolvem a formação da melanina são conhecidos com razoável precisão. Embora este mecanismo seja complexo, é relativamente simples, comparado com o da glicólise, devido a que somente um tipo de substrato e uma enzima são os responsáveis pela formação da melanina. Segundo Berton, citado por Lerner (53) em 1895, demonstrou-se que a cor escura que se formava no cogumelo, era devida a uma enzima, a qual chamou de "tirosinase", por atuar sobre substrato (tirosina). Mais tarde, esta enzima foi encontrada em certos frutos (maçã, pera, etc), como também em animais (vide parte de distribuição de melanina).

Essa oxidação enzimática da tirosinase sobre a tirosina, tinha como consequência a formação de um pigmento, que variava de coloração de pardo a preto. Segundo Kubowitz, citado pelo mesmo autor, afirmou que essa enzima, ou seja a tirosinase, para reacionar com a tirosina, necessita de cobre em sua estrutura, pois encontrou que quando esta enzima não continha cobre, se evitava a coloração preta. A tirosinase contém em sua estrutura uma concentração de Cu de 0,2% e que pode ser inibida por substâncias que formam complexos com o metal, tais como o cianeto de potássio,  $H_2S$  e diazida de sódio (70).

Quando isolada e purificada a enzima, o cobre nela se encontrava em estado cúprico ( $\text{Cu}^{++}$ ), e que posteriormente se reoxidaria por meio de oxigênio molecular (70). A faixa de pH da tirosinase não é muito ampla, pois apresenta máxima atividade a valores de pH de 5 a 7 (70). Segundo Lerner (53), o pH na qual a enzima exerce sua função catalítica, é de 6.8. A pH 5.0 a velocidade de oxidação decresce marcadamente.

Foi investigado por Pinkney (64), que o escurecimento do sangue dos crustáceos se deve a tirosinase a qual se encontra nos corpusculos do sangue, podendo ser liberada por citolises (desintegração das células). Segundo Alford e colab. (1), a formação da mancha negra no camarão, não era produzida pela ação microbiana, senão que era devida a ação da tirosinase sobre a tirosina.

Faulkner e colab. (27) descobriram que esta enzima era responsável pela formação da mancha negra no camarão, e que esta coloração pode ser diminuída em ausência de oxigênio e a pH 5,0 ou menos. O pH ótimo da enzima no crustáceo varia entre 6 a 8, sendo que as vezes a atividade da tirosinase continuava até pH 9.

#### MECANISMO DE FORMAÇÃO DA MELANINA A PARTIR DA TIROSINA

A tirosina pode ser oxidada no organismo a orto difenol ou 3,4-dihidroxi-fenil alanina, denominada correntemente dopa, numa reação catalizada pela enzima tirosinase. Este composto dopa, é a precursora da formação do pigmento que se origina em células especiais chamadas melanócitos, que estão presentes nos tecidos animais e vegetais.

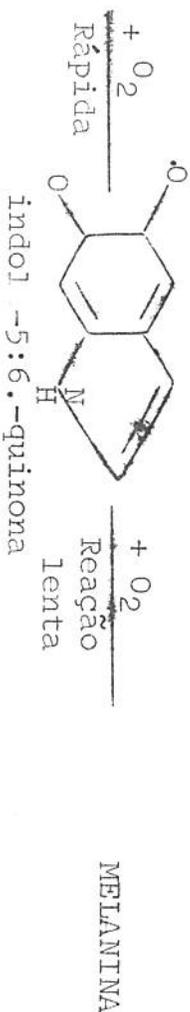
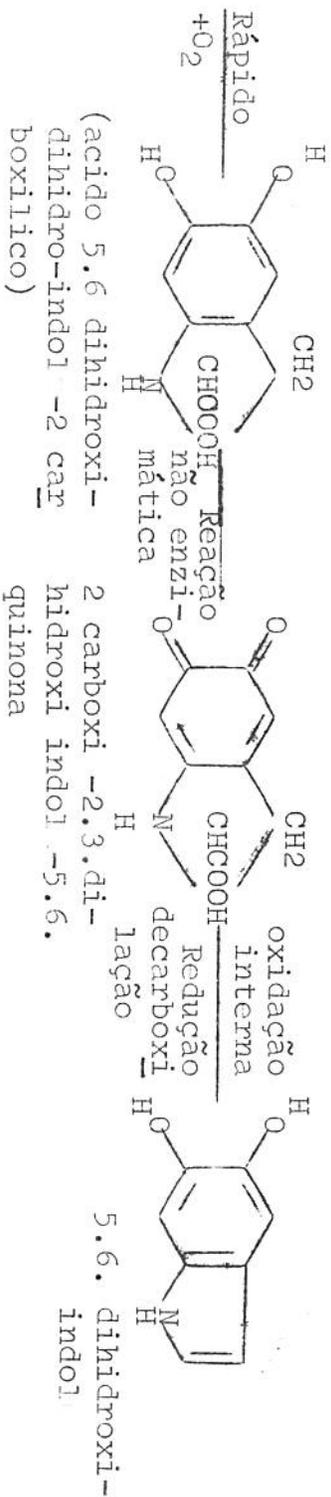
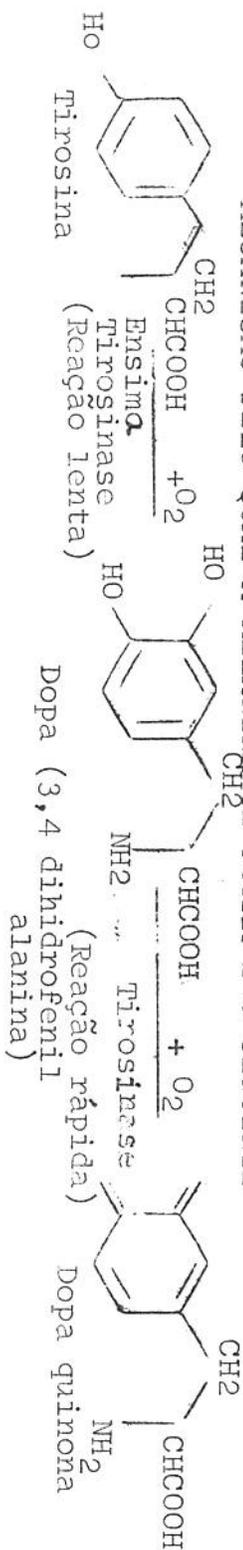
A formação da melanina se dá da seguinte forma: nos melanócitos existem pequena quantidade de enzima tirosinase, que ao reagir com a tirosina, forma o composto dopa; porém a enzima pode continuar oxidando-o em sua função o-difenol e formar o composto dopa quinona (fenil alanina 3,4-quinona). Este com-

posteriormente uma transformação intramolecu- lar irreversível que alguns admitem como espontânea e outros como enzimática, que formam o dihi indoleico reduzido (ácido 5,6 dihidroxi-dihidro-indol-2-carboxílico), que é uma substância incolor. Este leuco-derivado é oxidado novamente em seu grupo odifenol, formando um composto vermelho, a dopa cromo (2-carboxi-2,3 dihidroxi-indol 5,6 quinona). Todavia não se estabeleceu ainda se esta reação é enzimática ou não. Numa etapa superior, o dopacromo é descarboxilado, reduzido no grupo o-di fenol e dehidrogenado, pelo sistema enzimático, não completa- mente identificado, para converter-se em 5,6-dihidroxi-indol, que volta a oxidar-se a indol-5,6 quinona. Depois este últi- mo composto experimenta uma polimerização formando o pigmento melanina (22).

O mecanismo das reações de formação da melanina, está exposta no seguinte esquema:

FIGURA 11

MECANISMO PELO QUAL A MELANINA SE FORMA É O SEGUINTE



Extraído de Lerner (53)...

## MELANINA, PROPRIEDADES QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS

A melanina, segundo Well e Rastle citado por Lerner e Col (53), tem uma composição aproximada do pigmento tanto de fontes naturais como sintética: 57% de carbono, 3,5% de hidrogênio, 9% de nitrogênio, sendo a quantidade de oxigênio desconhecida. Em investigação posterior, Nicolas, citado por Lingleton (34), postula que a melanina tem uma fórmula empírica de  $C_8H_3O_2N_x$  ou 66,2% de carbono, 2% de hidrogênio, 9,6% de nitrogênio e 22% de oxigênio; e que a melanina em seu estado natural, é melanoproteína, com um conteúdo de 10 a 15% de proteína, sendo esta concentração reduzida a 0,2% por hidrólise ácida. A melanina é estável ao calor e a muitos reagentes; é ligeiramente solúvel, e pode ser branqueada pelo ácido ascórbico (60) e bisulfito de sódio (27). O pigmento pode reduzir o nitrato de prata amoniacal; não tem características de absorção de banda (70). A melanina pode ser branqueada por peróxido de hidrogênio e por solução de sais ferrosos. Estes ions ferrosos são absorvidos pelo pigmento, provavelmente por um processo de quelação (83).

A melanina, bioquimicamente é importante, devido a coloração que forma em animais, plantas e homem. A formação da melanina em mamíferos é regulada por fatores bioquímicos, alguns dos quais são definidos, tais como, concentração de enzima, substrato, ion hidrogênio, grupos sulfidrilos. Alguns destes fatores, como também outros, os quais são desconhecidos, são influenciados por fatores nutricionais, hormonais e neurogenicos (52).

## COMPORTAMENTO DA MELANINA FACE AOS PROCESSOS USUAIS DE PRESERVAÇÃO DO CRUSTÁCEO.

Segundo Duggam e colab (24) o camarão deixado por 6 horas a temperatura ambiente (25 a 30°C), embora armazenado em gelo, logo após deteriorou-se aos 6 dias de estocagem, provavelmente

devido à ação microbiana e reações químicas, tais como produção de bases voláteis e oxidações de ácidos graxos insaturados presentes no mesmo. Fieger e colab (29), verificaram que os crustáceos deixados muito tempo à temperatura ambiente (tempo não especificado), e depois armazenados em gelo, apresentaram decomposição aos 6 e 11 dias, com um aumento de contagem de bactéria, pH elevado e maior porcentagem de melanina.

A formação de melanina no crustáceo durante a estocagem, pode se dar se o produto é mantido à temperatura inadequada - de refrigeração, o que aumenta a reação enzimática da tirosinase sobre a tirosina. Alford e colab ( 1 ) observaram que a mancha preta no camarão, formou-se mais rapidamente quando este foi armazenado a 4°C, que quando se armazenou a 0°C ou 1°C

A temperatura máxima da tirosinase parece ser de 50°C , pois acima de 60 a 80°C, sua velocidade enzimática é diminuída (6). Na figura seguinte apresentamos o efeito similar da temperatura sobre a atividade da pirocatecolase.

Em geral, pode-se dizer, que a oxidação enzimática de tirosina e dopa aumenta com o aumento da temperatura. Um incremento na temperatura eleva também o período de indução na oxidação da tirosina.

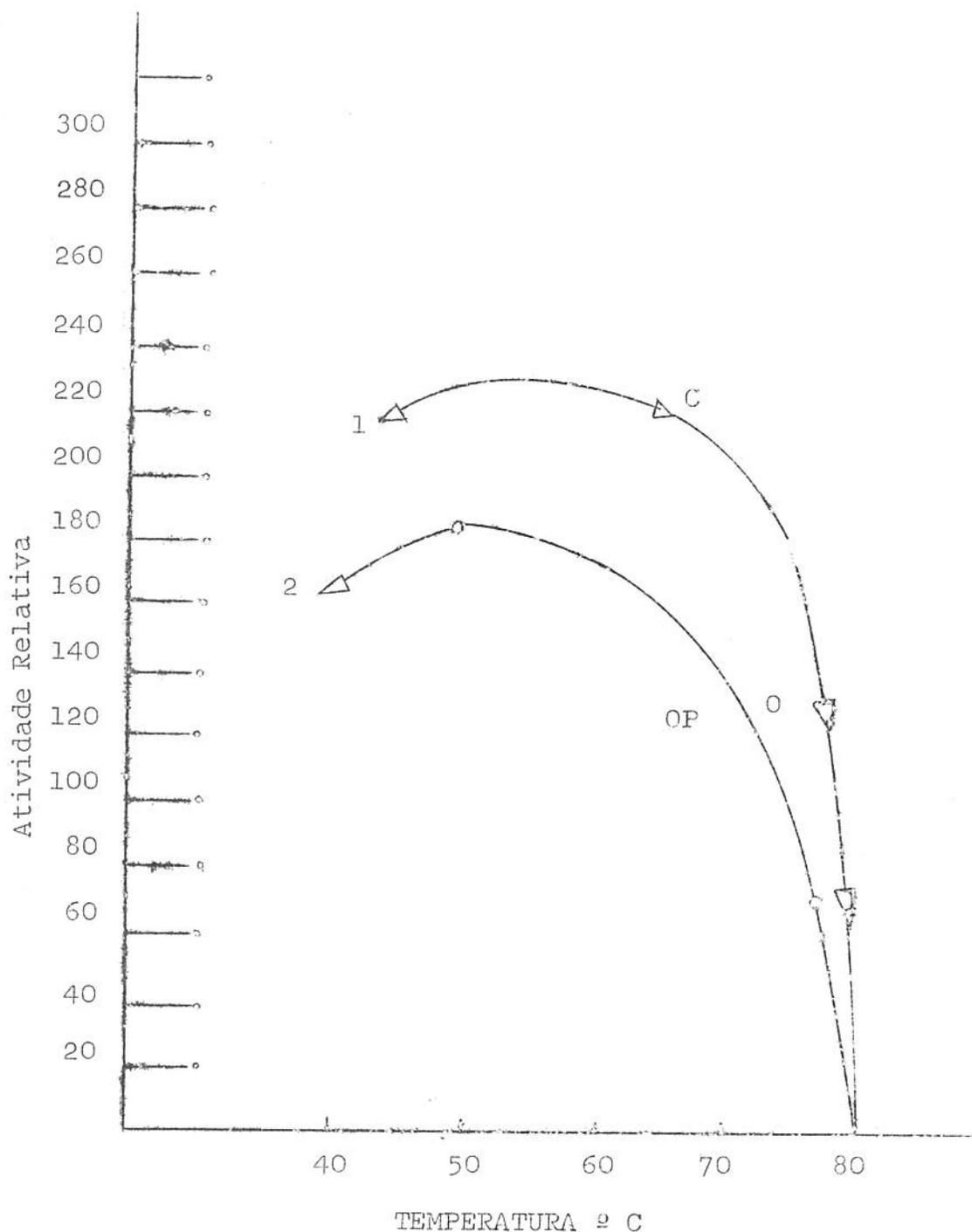


Fig. 12 - Efeito sobre a atividade da pirocatecolase em extrato de cabeça de camarão.

- NOTA: 1.) - Atividade de extrato de cabeça de *Penaeus astecus* antes de aquecimento.  
 2.) - Atividade de extrato de cabeça de *Penaeus setiferus* depois do aquecimento.  
 c.) - Efeito do aquecimento sobre a atividade da pirocatecolase ou tirosinase em extrato de cabeça de *P. astecus*.  
 p.) - Efeito do aquecimento sobre a atividade da pirocatecolase em extrato de *P. setiferus* - pericardial.  
 Extraído de M.E. Bailey e col (6).

Notou-se também que a formação da melanina no crustáceo é acelerada pela presença de oxigênio molecular, já que este, ativa a tirosinase. Lerner (52), afirma que a absorção total de oxigênio durante a reação com a tirosinase, está diretamente relacionada com a concentração inicial da tirosina (ou dopa) no meio de reação e se a concentração do substrato (dentro de limites) for incrementada duas vezes, a absorção total de oxigênio é semelhantemente aumentada duas vezes. A quantidade total de oxigênio requerido para oxidar a tirosina e dopa a melanina é difícil determinar com precisão. Segundo Duliere e colab. citado por Lerner e colab. (53), indicam que cada molécula de tirosina e dopa requerem aproximadamente quatro a cinco átomos de oxigênio respectivamente, para a conversão a melanina. Behn e colab (9), analisaram a oxidação do puramente fenol pela tirosinase, encontrando que o composto se oxidava mais rapidamente em presença de oxigênio. Faulkner e colab (27), observaram que a presença ( $O_2$ ), aumenta a formação da mancha negra no camarão.

Segundo Mason (57), a faixa de pH de 6,7 e 8 é considerada ótima a formação da melanina, com velocidades de reação enzimática incrementadas. Lerner (52), disse que o período de indução na oxidação enzimática da tirosina parece ser a um pH mínimo de 6.8. A valores altos de pH e menor que 6.8 o período de indução incrementa. Acima de pH 8.5 e abaixo de pH 5.0 o período de indução é prolongado indefinitivamente. Segundo Fieger (30), a formação da melanina no camarão produz-se a um pH 7.7, alto, mais ainda aceitável para consumo. Luna (55) entretanto, admite que o crustáceo com um pH superior a 7 não é apto para consumo, Vide tabela 4, 5 e 6, páginas 28, 29 e 30.

Na congelação a formação da melanina no camarão se produzirá pelos mesmos fatores anteriores.

Na parte de preservação dos pigmentos, se estudará as formas como pode prever-se a atividade catalítica da tirosinase nos processos de refrigeração e congelação.

## HEMOCIANINA

As hemocianinas constituem um grupo de pigmentos que se encontram nos moluscos e Artrópodos. Ocorrem livres no sangue, porém nunca nas células. São cupro-proteínas, que podem combinar-se reversivelmente com o oxigênio. Nas formas reduzidas são incolores, porém azuis nas formas oxigenadas (39). Entre os moluscos, as hemocianinas ocorrem nos gastrópodos e cefalópodos. Entre os Artrópodos, o pigmento tem sido identificado nos xifosurams, aracnídeos e crustáceos. Nestes últimos entretanto, sua distribuição está confinada aos decapódos e stomatópodos.

As pesquisas tem se concentrado quase que exclusivamente às espécies maiores dos decapódos (*Homarus*, *Palinurus*, etc.). Em muitos decapódos é, senão a maior, a única proteína presente no sangue livre de fibrinas; apesar da sua natureza proteínica, cristaliza-se, em alguns casos, com notável facilidade.

### PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

A HCy do *Homarus americanus* apresenta a seguinte composição elementar: C:53,07%; H:6.85%; N:16.78%; S:0.90% e Cu:0.187%. A do *Palinurus elephas*, apresenta uma concentração menor de cobre (0.148-0.170%). Os valores de carbono, nitrogênio, hidrogênio, enxôfre e cobre confirmam a natureza proteínica da molécula e demonstram que o teor de nitrogenio é maior do que nas hemocianinas isoladas dos gastrópodos e cefalópodos, porém semelhante ao da hemocianina do xifosurams *Simulus polyphemus*. O teor de cobre das hemocianinas das espécies *Homarus* e *Simulus*, é, por outro lado, menor do que os teores encontrados nas hemocianinas dos cefalópodos e gastrópodos, cuja concentração é de aproximadamente 0,25%. A relativamente alta concentração de cobre das várias hemocianinas representa uma notável participação do cobre da água do mar, a qual contém apenas 0,01 micrograma por 100 mililitros.

ESTRUTURA QUÍMICA

Segundo Goodwin (39), não há informação completa sobre a composição de amino ácidos das HCy, embora análises de 6 amino ácidos tenham sido feitas na HCy cristalizada do *Carcinus maenas*. Quando comparada com outras hemocianinas (por exemplo, a HCy da *Helix pomatia*), a do *Carcinus maenas*, contém mais arginina e histidina e pouco menos triptofano (vide tabela abaixo)

AMINO ÁCIDOS	CARCINUS MAENAS %	HELIX POMATIA	a°
Triptofano	4.27 - 4.92	5.45 - 6.36	.
Tirosina	4.52 - 4.92	4.28 - 5.0	.
Cistina	2.04 - 2.16	1.97 - 2.09	.
Arginina	6.65 - 6.82	5.07 - 2.37	.
Histidina	8.74 - 9.06	5.66 - 5.74	.
Lisina	7.44 - 7.61	7.28 - 8.02	.

NOTA: a° Valores de amino ácidos da *Helix pomatia* são da dos da espécie de *Carcinus maenas*; para comparação como exemplo típico das hemocianinas dos não crustáceos.

Tabela 8 - Extraída de Goodwin (39).

PESOS MOLECULARES

Louffer e colab. citados por Goodwin (39), verificaram pelo método de sedimentação que, o peso molecular da HCy do *Homarus Americanus* é de  $825 \times 10^3$ ; embora Svedberg e Pedersen, citado pelo mesmo autor, dão valores de  $752 \times 10^3$ . O peso molecular de  $825 \times 10^3$  para o *Homarus* parece ser o mais exato já que Svedberg e Pedersen não extrapolaram os coeficientes de sedimentação à concentração zero.

Embora a maioria dos HCy dos crustáceos apresentem velocidade de sedimentação (Sf) ao redor de 23 (não corrigida à con-

centração zero), o sangue de algumas espécies contém componentes menores com velocidade de sedimentação de 16,4 (vide tabela seguinte, página 50). Isso representa um peso molecular de cerca da metade do maior componente da Hemocianina.

Roche (72), afirma que em pH elevado e em presença de eletrólitos os componentes maiores tendem a se dissociar em moléculas menores. Os pesos moleculares mínimos das Hcy dos crustáceos calculado para Hcy com 1 átomo de cobre, estão ao redor de  $37 \times 10^3$  e os calculados na base da capacidade molecular de oxigênio, ao redor de  $74 \times 10^3$ . Entretanto, para a Hcy do *Palinurus* é de  $895 \times 10^2$ . Isso demonstra que uma molécula de oxigênio, se combina com uma unidade funcional da Hcy com 2 átomos de cobre.

O equilíbrio da Hcy com  $O_2$  indica que em certas condições forma-se um produto estável, com 4 moléculas de  $O_2$  (i.e. 8 átomos de cobre). Por sua vez, isso seria evidência de um peso molecular de cerca de  $300 \times 10^3$  (exemplo,  $358 \times 10^3$  para a Hcy do *Palinurus*). Esses valores correspondem perfeitamente ao peso molecular obtido por sedimentação da menor hemocianina dissociada, encontrada, em traços, o sangue de decápodos, cujo peso molecular representa a metade do relativo ao pigmento principal. (Tabela 9).

Espécies	Velocidade (a)
<i>Astacus astacus</i>	23.3 (16.3) <sup>b</sup>
<i>Calocaris macandreal</i>	34.0
<i>Cancer pagurus</i>	23.6 (16.4) <sup>b</sup>
<i>Carcinus maenas</i>	23.6 (16.7) <sup>b</sup>
<i>Dardanus arrosor</i>	16.1
<i>Homarus gammarus</i>	22.6
<i>Hyas araneus</i>	23.4
<i>Maja squinado</i>	27
<i>Nephrops norvegicus</i>	24.5
<i>Pagurus bernhardus</i>	17. (22) <sup>b</sup>
<i>Palaemon squilla</i>	16.1
<i>Palinurus elephas</i>	16.4
<i>Pandulus borealis</i>	17.4
<i>Saduria entomon</i>	23.
<i>Squilla mantis</i>	24.0
=	

Tabela 9.

Velocidade de sedimentação da hemocianina de crustáceos.

NOTA: a - Não corrigida à concentração zero.

b - Componentes menores

Extraída de Goodwin (39).

A tabela 10, apresenta alguns dados físicos de Hemocianina cristalina do *Homarus americanus*. Indicam que a molécula - da Hemocianina quando hidratada apresenta uma configuração de forma helicoidal, com uma revolução de  $32,2\mu$  de diâmetro e espessura de  $7,8\mu$  (39).

Através da Micrografia eletrônica comprova-se essa configuração, em que a Hemocianina do *Homarus*, em estado seco, apresenta a forma elipsoidal de revolução, com diâmetro de  $33\mu$  e espessura de  $7,5\mu$ . Essa forma é distinta da descrita - para a hemocianina do *gastropódo* *Busycon*, cuja configuração é formada de subunidade em forma de bastão, agrupadas em número de quatro (51).

PARÂMETROS	UNIDADES	DADOS
Coefficiente de sedimentação <sup>a</sup>	CGS	$24,5 \times 10^{-13}$
Viscosidade intrínseca	ml/ml	6,4 4,85
Incremento específico de refração	ml/10 <sup>-2</sup> gm.	0,002 0,00193
Volume efetivo específico da partícula hidratada	---	0,773
Volume parcial específico	---	0,74
Coefficiente de difusão	Cm <sup>2</sup> /seg	$2,77 \times 10^{-1}$
Provável hidratação	ML H <sub>2</sub> O/gm. de proteína seca	0,15

Tabela 10

Dados físicos sobre a Hemocianina cristalina do *Homarus americanus*.

NOTA: a - corrigida à água a 20°C e extrapolada a concentração zero.

Extraída de Goodwin (39).

### ESPECTRO DE ABSORÇÃO

A coloração azul da Hemocianina quando oxigenada é devida à presença duma banda difusa de absorção, com um máximo a 570 mu, no caso das espécies de Homarus e Loxorhynchus grandis e, a 570 mu no caso do Palinurus elephas e Palinurus interruptus. Na região do UV, a Hemocianina de Palinurus elephas apresenta uma banda de absorção de 278 mu, característica de proteínas que contém aminoácidos aromáticos. Uma banda tênue de absorção a 335 mu aparece ao se oxigenar o pigmento (69).

### NATUREZA DO COBRE NA HEMOCIANINA

Para Redfield, citado por Goodwin (39), não há evidência definitiva, se o cobre nas várias hemocianinas se encontra em estado cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) tanto na forma reduzida e oxigenada do pigmento.

Poucos trabalhos foram efetuados sobre as hemocianinas dos crustáceos, porém pesquisas recentes sobre os pigmentos de Limulus e do gastrópodos Busycon, sugerem cautela nas conclusões, já que a HCy oxigenada, mas não a forma reduzida de Limulus, dá a reação do biureto pela adição de alcali forte. Parece ser que o cobre está na forma cúprica ( $\text{Cu}^{++}$ ) no primeiro estado (oxigenada) e cuprosa no último (a reação do biureto requer cobre no estado cúprico ( $\text{Cu}^{++}$ ) para o desenvolvimento da coloração positiva). Mais recentemente tem havido considerável evidência de que o cobre na HCy do Busycon canaliculatum está quase totalmente no estado cuproso no pigmento não oxigenado e, que sò-

mente cerca da metade do cobre está no estado cúprico no pigmento oxigenado. Como apenas uma molécula de oxigênio é retida por dois átomos de cobre, o centro ativo deve consistir de cobre em cada um dos dois estados de valencia.

O oxigênio ligado na HCy oxigenada parece estar na forma de um "ion per-hidroxi de radical livre". Embora não se tenham observações mais recentes sobre o estado de valencia do cobre nas hemocianinas dos crustáceos, afirma-se que reagentes fortemente oxidantes, como o permanganato, são necessários para converter o cobre da hemocianina do Homarus do estado cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) a cúprico ( $\text{Cu}^{++}$ ) com formação de methemocianina. Não obstante, tal afirmativa foi posta em duvida no caso da hemocianina de Jasus lalandi. A methemocianina, como a própria hemocianina, é capaz de ser reversivelmente oxigenada. Sua relação com a oxihemocianina é ainda pouco esclarecida; entretanto é possível que ambos os átomos de cobre se encontrem em estado cúprico na methemocianina. A esse respeito Goodwin (39), afirma que a hemoglobina difere bastante da HCy. Em ambas Hb e  $\text{HbO}_2$  o ferro está no estado ferroso e, se for oxidado a férrico, se forma a methehemoglobina que não age como pigmento respiratório.

#### A EXISTÊNCIA DE UM GRUPO PROSTÉTICO NA HEMOCIANINA

Por analogia com a Hb, as hemocianinas eram frequentemente consideradas como contendo um pigmento semelhante a uma porfirina - férrica, contudo sendo o cobre o metal coordenador. Não há dúvida de que as hemocianinas não tem grupo prostético. Sugere-se que na HCy do Limulus, o grupo prostético fosse um sal complexo de cobre de um composto não identificado de enxôfre e um polipeptídio; não obstante, trabalhos sobre a HCy cristalina do Palinurus mostraram que esse "grupo prostético" é somente um sulfeto de cobre básico, contaminado com produtos de degradação de proteína.

A ausência de um grupo prostético contendo cobre foi finalmente demonstrado, convincentemente, com a HCy de Octopus, Helix e Cancer. O cobre pode ser removido sem apreciável desnaturação da proteína por dialise a pH 8,4 usando-se uma solução tampão de cianeto. Tal pigmento pode regenerar-se pela adição de cobre na proteína livre desse metal.

#### PONTO ISOELÉTRICO

As HCy dos crustáceos apresentam pontos isoelétricos que variam entre 4,6 a 4,95.

#### CAPACIDADE DE COMBINAÇÃO COM OXIGÊNIO

A capacidade de combinação da HCy cristalina de Palinurus com o oxigênio é de 25 ml/100gm do pigmento. Não há outros valores da capacidade de combinação de hemocianinas de outros crustáceos com o oxigênio, na literatura, mas visto que o teor de cobre e o peso molecular são da mesma ordem de magnitude nas espécies até agora examinadas, poderia afirmar-se não haver variação significativa da capacidade de oxigenação de uma espécie para outra. O teor de hemocianina no sangue dos decápodos é de cerca de 4 a 6%; a capacidade de oxigênio do sangue (Palinurus) é provavelmente de 1,5 ml/100ml, o que é só tres ou quatro vezes maior do que a da água de mar.

#### REAÇÃO DA HEMOCIANINA COM CO E COM CN.

Antigos trabalhos sugerem que as hemocianinas, como a hemoglobina, se combinam com o monóxido de carbono (CO), não obstante com muito menor afinidade. No entanto, determinações quantitativas do monóxido de carbono presente em soluções de HCy purificada do Palinurus, provam que não há maior concentração de monóxido de carbono do que as que se encontram nas soluções naturais. Daí se conclui que a HCy não forma com o CO composto análogo à carboxihemoglobina. A hemocianina ao reagir -

com o cianeto forma um complexo incolor liberando ao mesmo tempo, quantitativamente, o oxigênio combinado.

#### FUNÇÃO DA HEMOCIANINA -- TRANSPORTE DE OXIGÊNIO.

Sabe-se que a hemocianina tem a propriedade fundamental de combinar-se reversivelmente com o oxigênio em condições fisiológicas, assim absorver oxigênio sob tensões comparativamente elevada e o libertando em baixas tensões.

#### PODER TAMPÃO

Ambas as formas oxidadas e reduzida da hemocianina sendo ácidos fracos, desempenham papel importante no sistema tampão do sangue dos crustáceos. No caso do sangue do Maja squinado, sua ação tampão em fase do dióxido de carbono, embora considerável, é menor do que do sangue dos mamíferos, especialmente em baixas tensões de  $CO_2$ . Em contraste, o valor tampão da hemocianina do sangue de Limulus é comparável com a da hemoglobina.

#### AÇÃO OSMÓTICA

Visto que a hemocianina é o componente proteico maior no sangue dos crustaceos que a possuem, importancia significativa deverá estar associada com sua presença. Como em outros animais, o estado osmótico uniforme mantido entre o sangue e os tecidos e o meio ambiente dependerá entre outros fatores da pressão osmótica coloidal do sangue como também da pressão hidrostática e do gradiente iônico (39).

#### CAPACIDADE DE DECOMPOR $H_2O_2$ .

As hemocianinas isoladas dos crustáceos (Palinurus lephas e Maja squinado) e de molusco podem decompor o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) cataliticamente. Tal ação semelhante à da enzima catalase, não pode ser devida a uma possível contaminação desta enzima, pelas razões seguintes (40):

- a) ferro nunca foi encontrado na hemocianina.
- b) as curvas de atividade, segundo o pH das duas enzimas são completamente diferentes.
- c) Altas concentrações de  $H_2O_2$  inibem a atividade da catalase, porém não a da hemocianina.

A presença do cobre na molécula de HCy é especificamente essencial para sua atividade, pois quando o metal é removido - por dialise, por meio de cianeto de potássio, ela é bloqueada. É reativada pela adição de cobre. Quantidades equivalentes de cobre adicionadas à hemocianina não têm efeito sobre a decomposição do  $H_2O_2$ , não obstante o complexo de cobre com arginina - (mas não com qualquer outro amino ácido) é muito ativo. Isso - pode indicar que o cobre está ligado à hemocianina através de uma ponte com a arginina, um amino ácido do qual a hemocianina é particularmente rica. A atividade tipo catalítica da HCy dos crustáceos é trinta vezes menor do que a da hemocianina dos moluscos.

#### COMPARAÇÃO DA HCY DOS CRUSTÁCEOS COM A DOS GASTRÓPODOS E CEFALÓPODOS.

O teor de cobre da hemocianina dos crustáceos é menor - (0,18% comparado com os 0,25%). Os pesos moleculares das hemocianinas dos crustáceos também são menores ( $400 \times 10^3$  a  $800 \times 10^3$  comparados com  $1,3 \times 10^6$  a  $6,7 \times 10^6$ ). A afinidade por oxigênio, da hemocianina dos crustáceos é similar a das demais hemocianinas

A afinidade mínima se dá no limite ácido da neutralidade enquanto que na maioria das HCy ela se situa no limite alcalino.

#### PROBLEMAS NÃO RESOLVIDOS NA HEMOCIANINA

Os problemas mais interessantes, embora ainda por resolver, sobre as hemocianinas dos crustáceos, podem ser atualmente esclarecidos graças ao refinamento das técnicas analíticas,

tais como: a aplicação da electroforese em papel, para aclarar as identidades das hemocianinas das várias espécies, como também para revelar a presença de componentes menores; b) os novos métodos de análises de proteínas, como a cromatografia em papel, a cromatografia de gás, etc. para determinar a distribuição, qualitativa e quantitativa dos seus ácidos aminados e, por último, a elucidação da natureza das ligações Cu-proteína, através das técnicas de exame das ligações metálicas nas enzimas.

#### FATORES DE DEGRADAÇÃO DA HEMOCIANINA

Neste ítem estudaram-se os fatores que oxidam a cuproproteína à oxihemocianina ou que causam uma desnaturação do pigmento.

Segundo Classon (16), a luz ultravioleta degrada a hemocianina do gastrópodo *Helix pomatia*, e os raios ultravioleta produzem cisão nas duplas ligações do pigmento. Foi postulado por Hansen e colab (43) que o cobre contido na hemocianina, pode induzir à uma oxidação do pigmento e perdas de qualidade durante o processo de congelação e armazenamento do camarão. A presença de oxigênio, é outro fator que oxida a cuproproteína, devido a que o cobre presente no pigmento se oxida do estado monovalente ( $\text{Cu}^+$ ) a divalente ( $\text{Cu}^{++}$ ) (39).

A concentração de sais no produto durante a congelação, também poderá influir na oxidação ou desnaturação da hemocianina.

Segundo Osakabe (61), pelo aquecimento dos crustáceos (camarão, caranguejos e lagostas), a  $100^\circ\text{C}$  durante um tempo de 30 minutos, observou-se que, quando o produto é congelado ou enlatado, aparece coloração azul, o que provoca um sabor e aparência desagradável aos crustáceos.

3. PROCESSAMENTO INDUSTRIAL DO CAMARÃOA. Refrigeração

1. Sistema de refrigeração - Os métodos mais empregados para o resfriamento do camarão são:

a. por gelo.

b. por imersão em salmoura ou água do mar.

a. Refrigeração por gelo - consiste em colocar o produto diretamente em contato com o gelo, de forma a permitir a máxima transferência de calor, que será obtida, dispondo-se o produto entre duas camadas de gelo.

Segundo Lorentzen (54), as dimensões do gelo influem no resfriamento do produto, já que dimensões menores de gelo (picado, moído), produzem uma refrigeração mais rápida, pois a superfície de contato é maior.

O tempo de refrigeração de pescado (peixes, crustáceos e moluscos), depende de sua temperatura inicial, da relação gelo/peso do produto e das dimensões do gelo (54). Para Osoling, citado por Plank (65), o tempo de refrigeração por meio de cubos de gelo dependerá da dimensão de suas arestas, como se observa no quadro abaixo.

Comprimento médio das arestas (cm)	1	2	4	8
Tempo resfriamento : $Z_{+20}^{+1}$ (min.)	89	108	134	154

NOTA:  $Z_{+20}^{+1}$  representa o tempo de resfriamento de + 20°C a + 1°C

Tabela nº 11

Extraído de Plank (65)

Este cálculo foi feito para peixe magro, com um peso de - 1,25 kg e com  $\phi = 1$

NOTA:  $\phi = \frac{\text{quantidade de gelo}}{\text{quantidade de pescado}}$

b. Refrigeração por imersão (salmoura ou água do mar)-per<sub>u</sub>mite obter boa transferência de calor entre o produto e o meio refrigerante, visto que há um envolvimento total do produto . Obtém-se rápido resfriamento e eficiente operação.

Higman e colaboradores, citados por Plank (65) conservaram camarões em água do mar a uma temperatura de  $-1^{\circ}\text{C}$ , melhor que em gelo picado.

Colling (18) conservou camarões em água de mar a uma temperatura de  $-1,1^{\circ}\text{C}$  ou em solução de cloreto de sódio a 3% (por peso) e mantida a  $-1,1 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

O tempo de resfriamento em água do mar pode variar de vários minutos a uma hora e meia ou mais, dependendo das dimensões do pescado, temperatura e circulação da água. Para acelerar o resfriamento, deverá ser feita uma agitação contínua da salmoura, provocando assim o aumento do coeficiente de transferência de calor.

## 2. Trocas que ocorrem durante o resfriamento do produto na refrigeração por gelo e imersão.

Durante o resfriamento empregando os sistemas acima mencionados, observam-se trocas físicas e bioquímicas que afetam a qualidade do produto, e conseqüentemente, sua comercialização.

### 2. a. Refrigeração por gelo.

- dimensões irregulares de gelo, podem produzir rupturas dos tecidos do produto.

- uma lenta refrigeração por gelo pode dar lugar à congelação com desnaturação de proteínas.

- se o gelo empregado para a preservação do produto é obtido de água contaminada, transforma-se em fonte de microorganismos.

- o gelo e o produto devem ser dispostos de tal maneira que a água proveniente de fusão de camadas superiores, ao arrastar sangue e resíduos não escorra através de toda a superfície do produto, sendo recolhida por meio de canaletas, evitando-se

a contaminação do produto.

2.b. Refrigeração por imersão - (água de mar ou salmoura). No processo de imersão, deve-se ter em conta os seguintes fatores: efeito da temperatura e concentração da salmoura; efeito do tempo de imersão e composição da salmoura.

- concentração da salmoura; relacionada a temperatura, visto que as concentrações elevadas permitem obtenção de baixas temperaturas, podendo ocasionar congelamento lento, com rupturas do sarcolema e conseqüentemente desnaturação da proteína:

Ainda uma concentração elevada pode produzir uma penetração rápida de sal nos tecidos, tal concentração altera, ainda a relação água-proteína, perdendo esta última sua capacidade de dissolver-se (84).

- efeito do tempo de imersão: estudos realizados por Collins (54) sobre o camarão (*Pandulus* espécie), indicaram que a imersão em salmoura ou água do mar provocaram um aumento do crustáceo, devido à absorção de água e sal, sendo que tal aumento veio acompanhado de uma diminuição de cinzas e sólidos (componentes nitrogenados e outros constituintes). Ainda foi observado que o peso inicial de salmoura cresce durante o decorrer do tempo de imersão.

- Composição da salmoura: certas impurezas na salmoura (como sulfato de cálcio, cloreto de cálcio, de magnésio, sulfato de magnésio e sódio), podem afetar a aparência, textura e qualidade do produto (19).

O sal contendo impurezas de ferro e cobre tem efeito oxidante sobre as gorduras, em alta concentração de sal (47). Segundo Balter (8) impurezas de cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e sulfato de magnésio impedem uma rápida penetração de sal nos tecidos do pescado, alterando sua conservação.

3. - Sequência do processamento do camarão a ser refrigerado.

### 3.a. Captura

De grande importância, pois ao descarregar-se o produto no barco, deve-se tomar certos cuidados com o objetivo de evitar danos por choques e rompimentos dos tecidos por manipulação descuidada, que irão favorecer as ações microbiana e enzimática que deterioram o crustáceo e produzem compostos indesejáveis, como óxido de trimetilamina, manchas negras, coloração azul, desnaturação de proteínas, oxidação de lipídios (ácidos graxos insaturados).

O tempo de exposição do crustáceo na cobertura do barco também é um fator que pode provocar rápida deterioração do produto no armazenamento, como descoloração de seu pigmento astaxantina, formação de mancha negra e oxidação da hemocianina.

### 3.b. Seleção

Feita por tamanho, separando os maiores selecionando-se os que estão com bom aspecto físico dos ofendidos. Tal seleção deve ser feita o mais rápido possível, conforme razões expostas anteriormente.

### 3.c. Remoção das cabeças

Após a seleção, procede-se à remoção das cabeças, excepto quando são muito pequenas ou quando a captura é muito grande (46).

### 3.d. Lavagem

Após a captura, seleção e remoção da cabeça, é feita a lavagem para retirada de lodo, sangue e outras impurezas, que estão agregadas à superfície do crustáceo.

Esta lavagem é feita no barco, por meio de água do mar, o que dá ao produto um certo grau de preservação, pois o sal atua como agente preservativo, impedindo um grande desenvolvimento de microorganismos, durante o armazenamento em gelo.

### 3.e. Armazenamento em gelo

É de capital importância, já que implica uma preservação do produto durante um certo tempo, possibilitando que este produto refrigerado possa sofrer um novo tratamento durante sua industrialização por congelação ou liofilização.

O camarão é armazenado à temperatura de 0 a 2°C, onde sua preservação irá depender da transferência de calor para o gelo e da maneira como o crustáceo for disposto no mesmo. Segundo certos autores, como Lorentzen (54) e Plank (65) o produto deverá ficar entre duas camadas de gelo, cujos cristais devem ser da ordem de 2 a 5 cm., para maior transferência de calor e, conseqüentemente, maior rapidez da refrigeração.

Durante estudos de armazenamento, Luna (55) demonstrou que a astaxantina oxida-se mais rapidamente à temperaturas altas do que às temperaturas próximas da congelação (vide figura 4).

A astaxantina, como já foi mencionado anteriormente, pode ser oxidada através a oxidação das gorduras (26, 78).

Finalmente, pode ainda perder sua cor pela ação dos raios visíveis ou ultra-violeta (21, 2) quando o crustáceo é armazenado com embalagens que não protegem o produto.

O pigmento melanina pode formar-se durante o armazenamento, por temperatura inadequada de preservação, por ação do oxigênio, pelo aumento do pH e ação da luz que ativam a enzima tirosianase, a qual ao reagir com a tirosina, em sucessivas etapas, forma um pigmento negro, cujo mecanismo de formação é mostrado nas páginas 41, 42 e 43.

A hemocianina, em armazenamento, poderá oxidar-se a oxihemocianina, através diversos mecanismos: por desnaturação da proteína; pelo rompimento dos tecidos do camarão motivado pela irregularidade nos tamanhos dos cristais de gelo; por efeito de luz ultra violeta (16); pela presença de cobre em sua estrutura (43); por oxigênio que, ao reagir com o pigmento, le-

va ao aparecimento de cor azul.

A preservação dos pigmentos será estudada em ítem poste  
riores.

#### 4. Vantagens e desvantagens dos processos de refrigeração

Lorentzen (54), expos os pontos mais importantes na pre-  
servação por gelo:

- I- é de uso simples, seguro e razoavelmente barato;
- II- o gelo significa refrigeração armazenada, podendo ser produzido para longos períodos, a fim de nivelar o uso da capacidade disponível de refrigeração;
- III- mantem a temperatura próxima à 0°C, sem necessidade de qualquer outro método especial de controle;
- IV- bactericidas poderão ser adicionadas ao gelo, com o ob-  
jetivo de aumentar o tempo de conservação durante os  
últimos estágios do armazenamento;
- V- conserva úmida a superfície do pescado, impedindo res-  
secamento que, caso houvesse, afetaria desfavoravelmen-  
te sua aparência.

#### Desvantagens :

- I- poderá ser um agente de contaminação, devido aos micror  
ganismos existentes no mesmo;
- II- tendo cristais de dimensões e formatos irregulares, po-  
derá produzir deterioração por rompimento do tecido do  
produto;
- III- deve ser renovado constantemente, o que implica em cus  
to extra.

Já para refrigeração por imersão, as condições de conser-  
vação são bem próximas que as obtidas por gelo, pois nas

temperaturas próximas de 0°C, a superfície do produto agora se mantém em contato íntimo com a água. A vantagem principal, quando aplicável, é o manuseio bem mais eficiente do pescado por bombeamento (54). O custo da solução pode ser reduzido através do uso de cloreto de cálcio como fator coadjuvante à eficiência de refrigeração da água do mar. Quando purificada a solução pela retirada de certos metais, a solução se torna mais cara. Apresenta, no entanto, o inconveniente de exigir grande manutenção devido à corrosão.

## B. CONGELAÇÃO

Segundo Plank (65), o processo de congelação representa uma forte agressão à estrutura dos alimentos em seu estado natural.

Na congelação do pescado, pode-se embalar-lo previamente ou não. Neste último caso, é necessário usar-se um processo que reduza ao mínimo a desidratação e a oxidação da gordura durante o período de armazenamento.

Esta proteção é feita por aspersão de água sobre o produto após a congelação, repetindo-se o processo tantas vezes quanto necessário, para formar uma camada de gelo ou "glace".

Para o produto congelado e embalado a resistência do material empregado deverá ser suficiente para permitir estocagem à baixa temperatura, assim como deverá ter características especiais quanto à permeabilidade ao vapor de água e oxigênio.

### 1. SISTEMA DE CONGELAÇÃO

Os processos de congelação mais aplicáveis aos produtos de pesca são:

- a. imersão em salmoura ou água do mar fortemente refrigerada;
- b. circulação de ar frio;
- c. placas

a) Congelação por imersão - é obtida, mergulhando-se o

produto numa salmoura à baixa temperatura. O coeficiente de transmissão de calor é o ideal, visto que há um contato íntimo entre a solução e o produto a ser congelado (23).

Segundo Plank (65), o coeficiente de transmissão de calor dos alimentos à solução é pelo menos 10 vezes maior do que quando ar frio é utilizado na congelação. Ainda Plank (65), cita que este método apresenta o inconveniente de penetração de sal nos tecidos do produto, diversas pesquisas tendo sido feitas para reduzir a sua concentração.

Segundo Ottesen, citado por Plank (65), a penetração de sal pode ser reduzida pela aplicação de temperatura e concentração adequadas. Slavin (75), congelando o camarão por imersão em salmoura, reduzia a penetração com uma salmoura constituída de 20% de glicose e 20% de sal. Foram empregados também, em outros trabalhos, glicol e glicerina para diminuir a concentração de sal na carne de aves, não sendo ainda empregados em peixes ou moluscos ou crustáceos.

Outro sistema utilizado para congelação é o que faz uso do nitrogênio líquido. Tem a grande vantagem de reduzir a perda do produto durante o processo de congelação, como também o custo inicial do equipamento, que tende a compensar o alto custo do refrigerante.

O pescado congelado por aspersão de nitrogênio gasoso apresenta melhor qualidade do que quando congelado por imersão direta no nitrogênio líquido. Neste caso poderá haver mudança de cor, e a textura adquirir aspecto quebradiço, friável, resultantes da rápida congelação.

Melhoramentos nos projetos das instalações e dos equipamentos e principalmente, redução no custo do refrigerante (4) serão fatores decisivos para a evolução dessa técnica.

Segundo Dassow (20), o processo de congelação do camarão em salmoura dará resultados satisfatórios, quando:

- 1 - os camarões apresentam-se frescos e descabeçados;

- 2 - ~~for~~ empregado um pré-resfriamento, em água gelada;
- 3 - a temperatura da salmoura for mantida a 12°C (ou inferior), para reduzir a penetração de sal, removendo-se a salmoura logo após (4 horas depois) visto que mesmo depois de congelado, o camarão ainda absorve sal;
- 4 - ~~for~~ usada água (a 10 ou 20°C) na aspersão do produto e posterior armazenamento a - 17°C. (glasing).
- 5 - ao descongelar, usar água corrente a 16°C, e, finalmente,
- 6 - acondicionar o produto em embalagem à prova de umidade, para diminuir o possível efeito desidratante do sal presente.

O tempo de congelação varia conforme as dimensões do crustáceo. Vide efeito do tempo de imersão na página 69.

b. Circulação de ar forçado - Segundo Slavin (75), a congelação é obtida por circulação de ar previamente resfriado em recintos de dimensões reduzidas ou em túneis. O deslocamento do ar é provocado por meio de ventiladores, fazendo-o passar através de serpentinas, com circulação de fluido refrigerante, provocando o seu resfriamento.

A maioria dos congeladores operam com ar à temperatura de -35°C, e a velocidade sobre o produto variando de 2,5 m/seg. a 5 m/seg. Esse mesmo autor indica que velocidade abaixo de 2,5 m/seg., produz uma congelação relativamente lenta, afetando a qualidade do produto. Cita, ainda, que velocidades acima de 5 m/seg. aumentam os custos por hora de operação; e, consequentemente, o custo por quilo de produto congelado.

Ainda, a "queima" pela desidratação pode ocorrer quando o produto é congelado sem embalagem. A "queima" pode ser evitada mantendo-se a velocidade do ar a 2,5 m/seg. e controlando-se adequadamente o tempo de exposição ao ar.

No caso de camarões, estes são dispostos em caixas (vide

parte de embalagem à página 77) e, posteriormente, tais caixas são introduzidas no tunel de congelação, onde a temperatura do ar é de  $-40^{\circ}\text{C}$ , resfriado através de passagem em serpentina onde se processa evaporação de amonea. A velocidade do ar deve estar entre 2,5 a 5 m/seg.

Segundo Heen e colab, citado por Borgstron (44), o tempo de congelação de crustáceos em caixas de 5 lb é de 15 horas, para levar o produto de 10 a  $-40^{\circ}\text{F}$  ( $-12$  a  $-40^{\circ}\text{C}$ ), dependendo, ainda da carga introduzida no túnel.

c. Congelação por placas - O equipamento consiste em uma série de placas dispostas no sentido horizontal e colocados no interior de uma câmara isolada. Através de passagem de refrigerante, amonia ou refrigerantes 12 (dicloro difluor metano ou Freon -12:  $\text{CCl}_2\text{F}_2$ ) ou 22 (monocloro difluor metano:  $\text{CHClF}_2$ ), em circulação por tubos conectados a estas placas, obtem-se o resfriamento e posterior congelação, fazendo-se a aproximação das placas ao produto.

Este tipo de congelação é largamente utilizada na industria pesqueira, onde costumam-se usar caixas de papelão de 5 a 10 libras de produto.

Entre os tipos de produtos congelados por placas estão o filé de boi, camarão, filé de pescado.

O produto a ser congelado deverá estar acondicionado (embalado) e manter um espaço de ar mínimo no interior da embalagem.

Durante a congelação deverá ser mantido um espaço determinado entre as placas para se prevenir perdas mecânicas devidas ao excesso da pressão.

Para maior parte dos produtos, a espessura do espaçador deverá ser de 1/32 a 1/16 de polegada. Já na obtenção de blocos de filé de pescado congelados, é necessário o uso de uma bandeja de metal para se conservar o formato durante a congelação.

Dispõe-se sobre a bandeja os blocos de pescado e os espaçadores de madeira são introduzidos entre o último bloco e o fim da bandeja para que, ao se formar o gelo, possa haver espaço para expansão. A bandeja não é necessária para diversos outros produtos do mar embalados, tais como camarões ou pedaços de pescado, onde que a tolerância da embalagem fechada não é essencial.

As pesquisas demonstram que o tempo de congelação de pedaços de pescado embalado é maior comparado com os de filés de pescado também embalados, visto que o tempo aumenta com a espessura do produto (5). O contato íntimo, portanto, entre as placas e o produto é uma necessidade.

As placas do congelador são comandadas por um cilindro hidráulico que as afasta para a introdução do produto. Posteriormente, o mesmo cilindro baixa as placas, exercendo pressão constante sobre o produto. A temperatura no interior das placas é de  $-35^{\circ}\text{C}$  ou menor (13).

Para os camarões estes são dispostos na embalagem (vide embalagens de 5 libras-peso à página 67), que é introduzida entre as placas e resfriada até a temperatura desejada. O tempo de congelação dependerá da carga introduzida no congelador. Segundo Idyll, citado por Stanby (76), se o congelador for sobrecarregado, o tempo necessário para se obter a congelação é de aproximadamente 15 horas a uma temperatura de 10 a  $-40^{\circ}\text{F}$  ( $-12$  a  $-40^{\circ}\text{C}$ ).

2. Trocas que ocorrem durante a congelação do produto: imersão (salmoura ou água do mar refrigeradas), ar frio e placas.

a. Congelação por salmoura - segundo Holston e colaborado

res (45) na congelação do eglefim (peixe da familia do bacalhau) os fatores que podem dar causa à degradação do produto são:

- a. temperatura e concentração de salmoura
- b. período de imersão
- c. composição da salmoura
- d. conteúdo de sal que deve ter o pescado para sua comercialização.

a.) Temperatura e concentração

Sabe-se que a penetração do sal no peixe fresco durante a congelação varia diretamente com a temperatura da salmoura e que o aumento de sal ocasiona seus problemas de qualidade, quando a temperatura da salmoura atinge 15°F (-9,5°C) ou acima. É recomendável, pois, que para salmouras a 23%, a temperatura deva ser mantida abaixo de 10°F (-12°C). Um aumento na concentração provoca uma adição proporcional de sal durante a congelação do pescado.

b.) Tempo de imersão -

O tempo de imersão do pescado em salmoura é um fator determinante no aumento da percentagem de sal nos tecidos. Holston e colab (45) observaram que depois da congelação do pescado, este segue absorvendo sal porém em pequenas concentrações, denominando a este posterior fenômeno de, "penetração secundária".

Na tabela seguinte, observa-se que a penetração de sal da primeira imersão é maior que a penetração secundária. Nota-se ainda, que à medida que aumenta o tempo e a temperatura, também a percentagem de sal se eleva.

TABELA Nº 12

Variação do conteúdo de sal no eglefin imerso em solução de cloreto de sódio (23%) em diferentes tempos e diferentes temperaturas.

Tempo de Imersão	CONTEÚDO DE SAL					
	5ºF (-15ºC)		10ºF (-12ºC)		15ºF (-9,5ºF)	
	a	b	a	b	a	b
Horas	%	%	%	%	%	%
1	0,55	0,24	0,64	0,23	1,15	0,24
2	0,91	0,31	1,10	0,26	1,27	0,26
4	1,22	0,20	1,29	0,24	1,49	0,21
24	2,09	0,84	3,02	0,93	5,15	3,01

NOTA - a- primeira penetração, para espessura de 1/4 de polegada (6,3 mm).

b- segunda penetração, para espessura de 1/4 de polegada (6,3 mm).

Extraída de Holston e col. (45).

Segundo Montgomery e col. (58), camarões cuja classificação foi de 21-25 por libra, em salmoura, necessitam de 10 a 20 minutos para congelar-se a uma temperatura de -17ºC. Dassow (20) observou que para camarões descabeçados, ao número de 20 por libra, foram necessários 10 minutos para congelação em salmoura com circulação a 5ºF (-15ºC) e que grandes crustáceos são congelados em 15 minutos.

Entretanto camarões pequenos (descabeçados) ao número de 35 por libra, foram congelados em 4 minutos a uma temperatura de 15 a 23ºF (-9,5 a -5ºC).

A alta concentração de sal nos peixes, crustáceos e moluscos produz, segundo diversos autores (48, 55, 65, 47), desnatu

ração de certas frações protéicas, redução da qualidade, textura friável, além de favorecer oxidação de gordura (ação catalítica, do NaCl, provavelmente).

Este último efeito, segundo Tarr, citado por Faulkner, (23), contribui para a oxidação da astaxantina.

c. Composição da salmoura -

Holston e col. (45) concluíram que certas impurezas na salmoura, como cloreto de cálcio e cloreto de potássio retardam a penetração de sal no peixe eglefin

d. Conteúdo de sal para comercialização de peixes e crustáceos

O conteúdo de sal, segundo Holston e col. (45), no peixe eglefin não deve ultrapassar de 0,9 a 1,2% para obtenção de ótima qualidade para comercialização, sendo que na descongelação em água, esta percentagem pode ser reduzida a 0,5 ou 0,6%.

No camarão, segundo Montgomery e col. (58) o conteúdo de sal não deve exceder de 1 a 1,5% quando o período de congelação é menor de uma hora.

Segundo Dassow (20), após a captura, o camarão deve ser congelado imediatamente em salmoura. Após 24 horas de imersão, a percentagem de sal chega a 2,5%.

b - Congelação por circulação de ar frio -

Este sistema, descrito à pagina 69, pode provocar uma desidratação do produto, quando a velocidade do ar atinge a 5 m/seg.

Ainda, a distribuição de ar no túnel deve ser uniforme, - pois uma circulação deficiente prejudicará o tempo de congelação. Pode dar lugar, também à formação de cristais de grandes dimensões, com a conseqüente ruptura dos tecidos do produto. A congelação lenta também provocará concentração de sais, ocasionando desnaturação de certas proteínas (65).

Uma publicação citada por Gomes (42), recomenda alguns cuidados para se evitar a desnaturação de proteínas e ruptura de tecidos do pescado:

a. que o processo de congelação, seja por imersão em salmoura, circulação de ar ou placas, deve permanecer, no máximo, duas horas na faixa crítica de temperatura, ou seja de 0 a -5º C.

No gráfico seguinte (figura nº 14), que estabelece a relação temperatura x tempo, se observa que, à medida que aumenta o tempo de congelação, a zona máxima de crescimento de cristais é maior.

Já na congelação rápida, a formação de cristais, é menor. Segundo Weld citado por Stansby (76), a relação do crescimento de cristais está relacionada com a espessura do produto (peixes, camarões, etc), e com a velocidade de congelação.

Por outro lado, o tamanho dos cristais de gelo favorece a perda do líquido no produto depois de congelado.

b. que os blocos de pescado não devem ser retirados do congelador enquanto a temperatura no centro do produto não atingir -18ºC, visto que o centro é a última parte a congelar.

Na tabela nº 13, (pág. 74) observa-se, que à medida que baixa a temperatura de congelação, a proporção de água congelada aumenta.

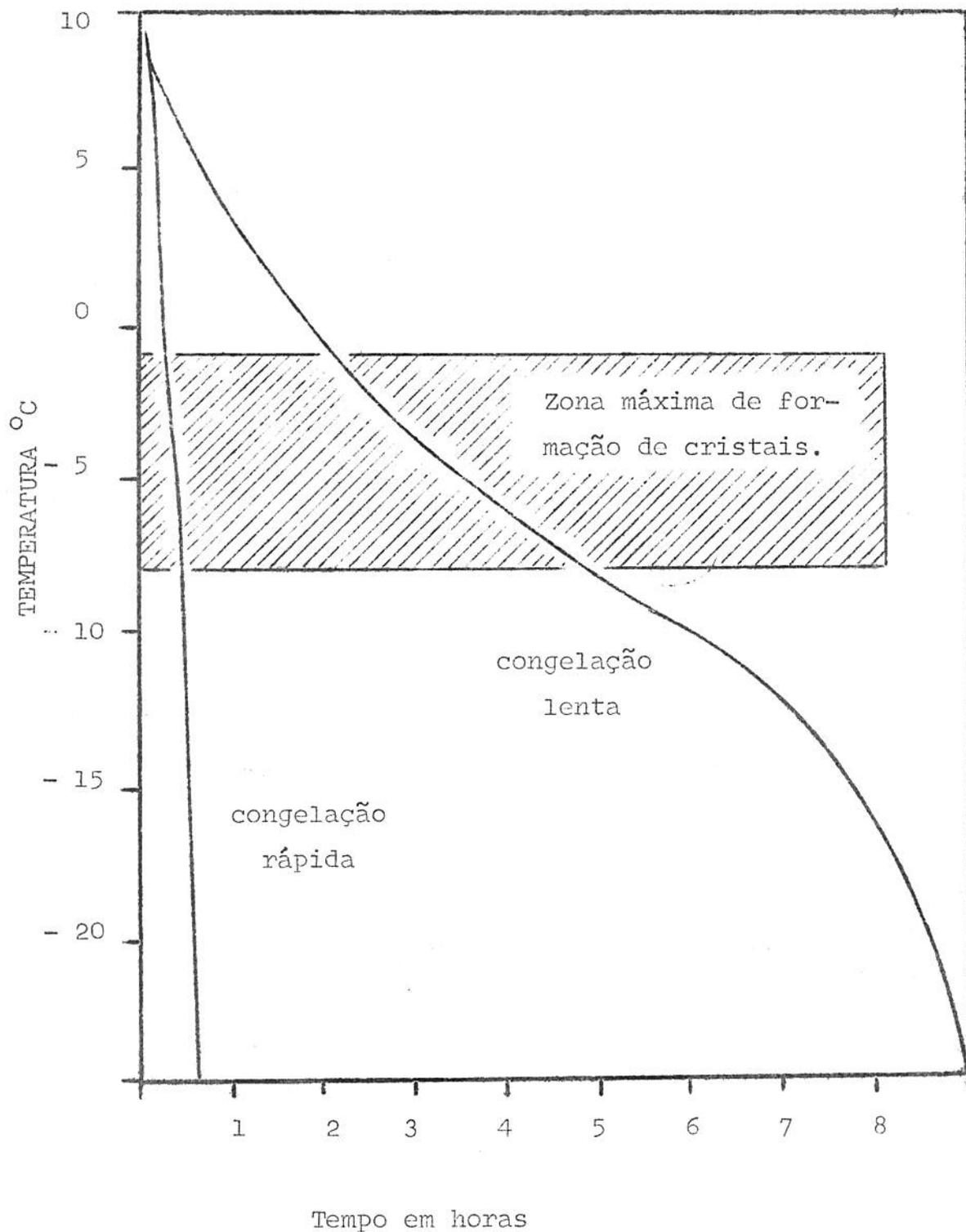


Fig. 14 - Extraído de Stansby (76).

Tabela nº 13.-

Proporção de água congelada no pescado a diferentes temperaturas.

Temperatura		Proporção de água congelada %
°F	°C	
30,3	-1,2	0
30,0	-1,1	32
28,0	-2,2	61
26,0	-3,3	76
24,0	-4,4	83
22,0	-5,5	86
18,0	-7,7	89

Extraído de Stansby (76).

c. Congelação por placas - este processo pode produzir um desgarramento do músculo de certas espécies de pescado, provocado pela excessiva pressão das placas sobre o produto.

Este aumento de pressão, pode ocasionar, também, uma congelação lenta, visto que diminui a transferência de calor através do produto (5).. A congelação lenta produz ainda cristais de grandes dimensões, ocasionando ruptura no sarcolema e consequentemente desnaturação de certas proteínas, com perda posterior de textura (65.). Pode dar lugar também a reações químicas e bioquímicas, acelerando a velocidade de deterioração do pescado. Por exemplo: a oxidação de ácidos graxos insaturados (ácido linoleico), pela ação da enzima lipoxidase.

### 3. Sequência do Processamento do camarão para congelação

Os camarões são congelados nas seguintes formas (31):

1. sem cabeça
2. com casca e sem casca
3. cozido e não cozido
4. com cabeça e sem casca

Segundo Zaitzev e colab (84), o esquema de operações é o que exhibe a fig. 15.

a. Matéria prima - o pescado (peixes, crustáceos, moluscos), crús ou cozidos destinados à congelação devem apresentar qualidade idêntica ao produto fresco destinado a consumo humano.

O pescado uma vez capturado, deve ser mantido a temperaturas mais próximas de 0°C.

Segundo Capont (14), o camarão a ser congelado deve apresentar as seguintes características:

1. côr brilhante
2. olhos protuberantes
3. segmentos rigidamente unidos ao corpo
4. carne aderida à casca

A importância da seleção e preparação do produto é muito importante, pois nenhum alimento de qualidade inferior não pode ser melhorado após a congelação.

b. Lavagem - consiste na remoção do limo do mar através de aspersão de água, caso vá sofrer congelação imediata. Quando refrigerado em gelo, ao chegar ao porto, deverá ser lavado para retirada de sangue ou substâncias químicas adicionadas ao gelo para a melhor conservação do crustáceo.

c. Cozimento - Para Hansen, e colaboradores (43), o cozimento deve ser aplicado durante o processamento ou pouco antes do consumo, onde o tempo e temperatura empregados dependem das di-

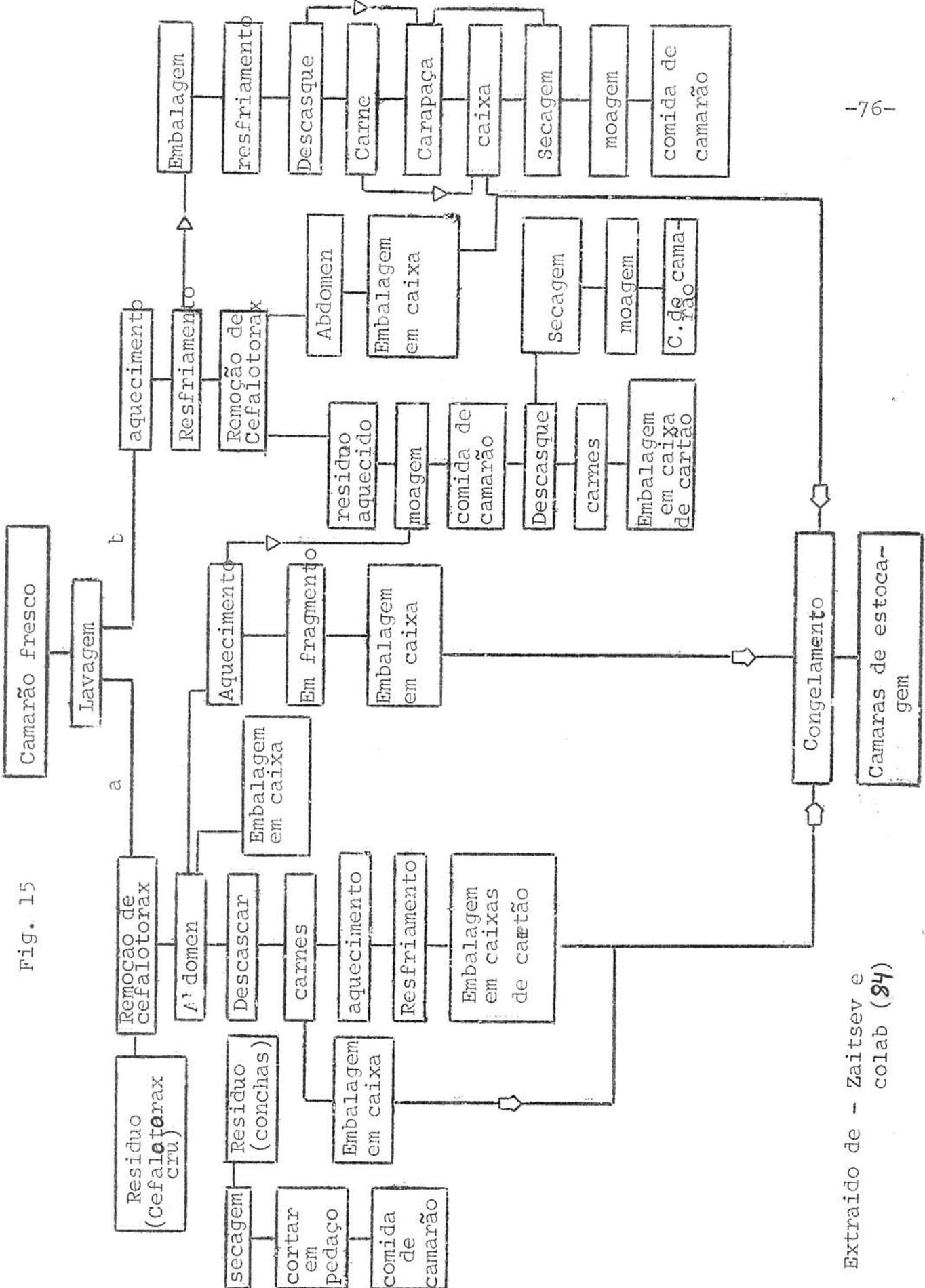


Fig. 15

Extraído de - Zaitsev e colab (84)

mensões e das espécies de crustáceos.

Pequenos camarões podem ser cozidos a 90-100°C durante 2 a 5 minutos. Para Zaitzev e colab. (84) camarões grandes devem sofrer cozimento por um período de 8 a 10 minutos, à 90-100°C.

O emprego do calor neste caso, inativará a tirosinase, responsável pela formação da melanina.

Provavelmente, tempos maiores poderiam conduzir à degradação da astaxantina e à desnaturação da hemocianina, com o aparecimento de coloração azul nos crustáceos.

O calor destrói ainda as formas vegetativas dos microorganismos presentes no produto, mas não os esporos de Bacillus e Clostridium (43), visto que o tempo é relativamente curto para se produzir a destruição de tais esporos.

Montgomery, citado por Hansen e colab. (43), indica que o emprego de vapor para aquecimento do camarão permite obter uma maior retenção da astaxantina.

d. Resfriamento - após o cozimento, os camarões são rapidamente resfriados a 30°C para prevenir o aquecimento excessivo da carne e a fixação da mesma à carapaça. (84).

e. Remoção de cefalotórax - Para camarões sem cabeça, após o resfriamento, removem-se o cefalotorax e a carne é separada da carapaça. A congelação não deverá ser considerada como meio adequado para falsificar produtos de dimensões reduzidas e de qualidade inferior.

f. Embalagem - A embalagem promove a proteção contra perdas de água e a conservação a qualidade durante a congelação, armazenamento e distribuição. Deverão ter certas características, como resistência à tração, à ruptura, ao corte. A elasticidade do material empregado, assim como suas juntas, deverá ser adequada para resistir à pressões oriundas do processo de congela

ção (dilatação). A elasticidade deverá portanto, ser mantida mesmo à baixa temperatura e adaptar-se perfeitamente à forma do produto para evitar sua desidratação no interior da embalagem, o que poderá dar lugar à "queimadura" por congelação. É indispensável que o material de embalagem seja impermeável ao vapor de água com o objetivo de se evitar dessecação do produto. Para uma determinada embalagem, esta permeabilidade depende da temperatura e da umidade relativa do ambiente. Esta permeabilidade, para pescado, (incluindo as juntas e o envoltório) não poderá ser superior a 0,2mg/m<sup>2</sup> em 24 horas, a -20°C (4°F) e com uma umidade relativa de 80% no meio ambiente.

A permeabilidade aos gases (ar, oxigênio) deve ser suficientemente baixa para reduzir ao mínimo as alterações por oxidação durante o armazenamento. Ainda, a embalagem não deverá permitir a passagem de odores, devendo ser resistente à substâncias graxas para a perfeita proteção do produto antes e depois da congelação, sobretudo se o pescado tem alto teor de gordura ou se foi cozido.

Finalmente, o material da embalagem não deverá se aderir ao produto (67).

Segundo Fieger e colab (31), diversas dimensões de caixas de papelão são empregadas para a embalagem do camarão: caixas pequenas de 8, 10 e 12 onças; caixas grandes de 2 1/2, 5 ou 10 libras onde, segundo a operação de congelação, as caixas poderão estar abertas, promovendo-se o glaciamento por aspersão de água fria sobre a superfície do produto congelado. A quantidade de água de glaciamento usada para uma caixa de 5 lb é de cerca de 8 onças.

Após o processo, os camarões são cobertos e as embalagens, são fechadas e invertidas rapidamente.

O uso de caixas de grande tamanho é desaconselhado, visto que a camada de gelo formada durante o glaciamento pode se romper durante o armazenamento, promovendo uma desidratação do

produto. O mesmo Autor (31) indica que queimaduras por congelamento poderão ser evitadas pelo uso de caixas feitas de papelão à prova de umidade e vapor.

Segundo alguns autores, Hansen e colaboradores (43), no curso de camarões em sacos de polietileno, com vácuo, se eliminam as perdas de peso e de evaporação, como também diminui a oxidação do pigmento, das substâncias graxas e dos componentes que formam o sabor.

Os sacos plásticos podem ser de polietileno puro ou laminado à prova de umidade e vapor. A espessura varia de 0,4 a 0,8 milésimos de polegada (42). Após, são introduzidas em caixas de papelão com revestimento de parafina ou papel celofane.

g. Congelamento - já explicada anteriormente, dentro dos itens de sistemas de congelamento

h. Armazenamento - após a congelamento, os produtos devem ser introduzidos em câmaras de armazenamento até sua distribuição comercial.

Segundo Fieger e colab (31), os camarões congelados devem ser armazenados à temperatura de  $0^{\circ}\text{F}$  ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) ou preferivelmente mais baixa, visto que o desenvolvimento de sabor de ranço no crustáceo é minimizado.

Gomez (42) recomenda temperaturas de  $-20$  a  $-25^{\circ}\text{C}$  para o armazenamento de camarões, visto que temperaturas mais baixas significam maior custo.

Segundo Dassow (20), os camarões congelados por imersão devem ser conservados a  $-18^{\circ}\text{C}$ , para um tempo de estocagem de 7 a 12 meses.

#### 4. Fatores que podem alterar o camarão armazenado -

As flutuações de temperatura no armazenamento são fatores que degradam o produto congelado, visto que irão produzir va-

riação das dimensões dos cristais de gelo, com danos ao tecido. A variação da temperatura não deverá ser superior a + 2°C, para evitar desidratação do produto (75).

#### As perdas de pesos

Plank (65) afirma que a armazenagem de alimentos congelados em câmaras de congelação pode produzir por evaporação (sublimação), perdas de pesos consideráveis que, prescindindo de perdas de substância, também tenham como consequência uma redução do valor dos mesmos devido à dessecação da superfície. Em contraposição à dessecação de alimentos frescos, não se dá no estado congelado, transporte de umidade do interior à superfície. Durante a armazenagem prolongada na superfície do pescado se forma uma capa seca porosa devido à sublimação dos pequenos cristais de gelo. Na superfície gretada que se forma, desta maneira, podem ter lugar indesejáveis processos de oxidação, provocados pelo oxigênio do ar que levam à descoloração e perdas de sabor, favorecendo-se a absorção de olores estranhos. Esta camada dessecada, cujo conteúdo em água se reduz até 30-35% pode representar 3% do peso total dos alimentos.

Segundo Peter e colab. (63), em camarões armazenados de 0 a -5°F, observa-se perdas de 1,8 a 2% depois de 9 meses e de 3,6 a 4,4% depois de 15 meses de estocagem.

A redução do peso no armazenamento é devida à perda de umidade no produto, onde tem grande influência a umidade relativa do ambiente e a diferença das temperaturas entre este mesmo ambiente e a serpentina do evaporador que o resfria.

Zaitzev e colab. (84), em estudo sobre peixe congelado, observaram que o ressecamento do produto depende dos seguintes fatores:

- a. espécie
- b. condições e dimensões do pescado
- c. tipo de embalagem

Para evitar a influência da umidade relativa sobre o pescado, a temperatura de armazenamento deve ser a mais baixa possível, mantendo-se esta unidade de 80 a 90% (5), usando-se, ainda, embalagem à prova de vapor de água.

No armazenamento podem ocorrer trocas bioquímicas, como desnaturação de proteínas, oxidações de matéria graxa, degradações de pigmentos do camarão.

A desnaturação das proteínas pode ser provocada por uma congelação lenta do produto quando a temperatura da câmara flutua demasiadamente, dando origem a cristais grandes no interior do tecido gradientes de concentração salina, ou por reações de enzimas que, ao se aumentar a temperatura, podem degradar proteínas e oxidar ácidos graxos insaturados.

Este último fenômeno, segundo Tarr, citado por Faulkner (26), oxida a astaxantina. Outro fator de degradação do pescado armazenado é a presença de oxigênio.

##### 5. Características mais importantes dos processos de congelação.

Serão estudados os fatores mais importantes nos processos seguintes de congelação do camarão:

1. imersão
2. circulação por ar frio
3. por placa

##### 1.- As vantagens do processo de congelação por imersão, segundo Fieger e colab, citados por Tressler e colab (81) são:

- a. rápida transferência de calor devido ao perfeito contato entre o meio refrigerante (salmoura) e o produto;
- b. obtem-se alta qualidade do produto;
- c. reduz-se o custo de manutenção do equipamento;
- d. elimina o processo de congelação em tunel;
- e. produz congelação rápida e eficiente;
- f. obtem-se um glacemento no produto, o qual reduz a de-

hidratação no armazenamento;

g. permite rápida descongelação do camarão, visto que a congelação é individual.

As desvantagens deste método de imersão, como foi visto à página 68-71 são:

a. em temperaturas mais altas, a penetração de sal no tecido do produto aumenta;

b. é difícil manter-se a solução isenta de contaminantes;

c. a concentração da solução não se mantém constante durante a congelação.

2. Nos processos de congelação por ar frio, as vantagens são:

a. congelação rápida devido à circulação de ar frio à  $-36$  ou  $-40^{\circ}\text{C}$ ;

b. curto período de congelação;

c. o camarão pode ser congelado individualmente ou em blocos ou filetes, colocados em bandeijas ou cestas.

Segundo Ranken (68), as desvantagens dos congeladores por ar são várias:

a. a maior duração da fase de congelação, em comparação a outros sistemas;

b. o maior espaço ocupado pelo equipamento, em comparação com os outros sistemas;

c. a maior mão de obra necessária para a carga e descarga dos túneis;

d. o calor cedido pelos motores dos ventiladores fazendo com que a carga térmica total a ser retirada aumenta, assim como a potência necessária, podendo atingir até 20% a mais;

e. requer descongelamentos periódicos das serpentinas resfriadoras do ar, o que reduz o tempo de utilização dos túneis.

Para velocidades menores de  $2,5$  m/seg., ocorre congelação lenta com perda de qualidade do produto, maior tempo de congelação e maior custo por unidade.

Velocidades maiores de 5,0 m/seg., produzem ressecamento excessivo no produto, podendo ainda ocasionar deterioração, ao mesmo tempo que exigem maior trabalho do equipamento, aumentando o custo de produção.

### 3. Vantagens e desvantagens do congelador de placas

Segundo Angel e colab. (3), em um estudo sobre congelador de placas, automático, as vantagens seriam:

- a. obtenção de produto de qualidade, pela aceleração do processo;
- b. obtenção de melhor aparência da embalagem, produzindo um produto uniforme;
- c. a operação manual do produto é eliminada;
- d. necessita somente de um descongelamento por semana.

Segundo Tressler (81), a eficiência dos congeladores de placas depende do contato entre a placa e o produto a ser congelado, tipo e temperatura do produto e temperaturas do refrigerante.

Pohlmann (66), salienta a grande capacidade de produção em pequenos espaços, à razão de 10 m<sup>3</sup> para 600 - 800 kg de filés de pescado por hora, apresentando poucas perdas e relativo baixo consumo de energia.

Ranken (68), em estudos sobre congeladores de placas de forma horizontal e vertical, conclui que o primeiro é particularmente empregado para congelação de filés de pescado já empacotados para venda direta ao consumidor, podendo também ser utilizado para peixes inteiros.

A principal desvantagem deste tipo de congelador horizontal reside no uso de bandeijas para o pescado, implicando em mão-de-obra maior. Requer ademais, bastante espaço para abertura das portas, carregamento de bandeijas e ainda requer descongelamento frequente apesar de menos do que o exigido.

Entretanto, no congelador de placas vertical, não são ne-

cessárias bandeijas. Obtém-se a congelação em período curto, visto que este sistema é de congelação rápida. A qualidade do produto descongelado é semelhante ao do pescado com tres ou quatro dias após a captura e conservado em gelo.

Este tipo de congelador ainda ocupa um espaço mínimo em relação a outro sistema qualquer. Permite congelação de pescados em blocos de até 100 mm. e pode ser montado em diferentes posições na linha industrial, dando maior flexibilidade da instalação.

### c. Liofilização

O processo de liofilização é realizado em três etapas (72)

(1) Congelamento prévio: o produto a ser seco é completamente congelado.

(2) Secagem primária; o produto congelado se mantém a baixa temperatura enquanto o gelo se sublima.

(3) Secagem secundária: quando o último cristal de gelo desapareceu, o material é cautelosamente aquecido e a temperatura do produto é elevado moderadamente (+ 20 a + 60°C ). A secagem final é então levada sob alto vácuo de modo a retirar a água que não cristalizou previamente e que está fortemente ligada por adsorção ao produto parcialmente sêco. Durante este período, a umidade residual é progressivamente reduzida até um nível consistente com a preservação à temperatura ambiente.

No fim do processo o produto mantém a forma e textura originais, mas está sêco e por isso tem uma estrutura leve e porosa. Neste estado ele pode ser armazenado por tempo indefinido, desde que convenientemente embalado.

Quando se deseja, é fácil reconstruir o produto original por simples adição de água. Graças a sua alta permeabilidade, a água será facilmente absorvida por esta substância "liofílica" e rapidamente o material sêco recuperará o aspecto original e as propriedades iniciais.

1. (1) O processo de congelação pode afetar o produto a ser liofilizado. Segundo Kuprianoff citado por Karel e colab. (50) os fatores pelos quais podem diminuir a qualidade do produto são: (a) formação de cristais de g $\hat{e}$ lo que podem danar a estrutura dos componentes dos alimentos pela ação mec $\hat{a}$ nica; (b) sob estas condi $\hat{c}$ ões, resta uma fra $\hat{c}$ ão consideravel de água n $\hat{a}$ o congelada, resultado uma alta concentra $\hat{c}$ ão de eletrólitos na água n $\hat{a}$ o congelada que pode causar desnatura $\hat{c}$ ão das proteínas; (c) o tamanho e a distribui $\hat{c}$ ão do g $\hat{e}$ lo afetam a velocidade de rehidrata $\hat{c}$ ão, e também o tempo de secagem e a varia $\hat{c}$ ão de temperaturas durante a secagem e (d), que a estrutura do g $\hat{e}$ lo afeta a porosidade do material seco, a rehidrata $\hat{c}$ ão e a capacidade de reten $\hat{c}$ ão da água.

Iusk e colab. (56), estudando o efeito da temperatura de congelação no camarão a 0 $^{\circ}$ F e - 320 $^{\circ}$ F (-18a - 194, 4 $^{\circ}$ C), esta última temperatura foi obtida com nitrogenio líquido encontrou-que o tempo de secagem para -18 $^{\circ}$ C, foi de 8 horas, enquanto que para 194 $^{\circ}$  4 $^{\circ}$ C foi de 9.5 horas. Esta diferen $\hat{c}$ a de tempo de secagem, segundo o mesmo autor, foi devida à congela $\hat{c}$ ão lenta que produz cristais grandes que formaram uma camada porosa seca no produto, permitindo uma maior transfer $\hat{e}$ ncia de calor. Entretanto a congela $\hat{c}$ ão rápida forma cristais pequenos deixando poros reduzidos que dificultam a transfer $\hat{e}$ ncia de calor no produto.

A tabela seguinte demonstra o tempo de secagem a -18 $^{\circ}$ C e a -194, 4 $^{\circ}$ C.

Temperatura da placa		Pressão da camara ( $\mu$ )	Temperatura de congela- ção	
$^{\circ}\text{F}$	$^{\circ}\text{C}$		$^{\circ}\text{F}$ (-18 $^{\circ}\text{C}$ )	-320 $^{\circ}\text{F}$ (-194. 4 $^{\circ}\text{C}$ )
250(121,1)	125(52.2)	100	8	-----
	175(79.4)	100	8	9 1/2
175(79.4)	125(52.2)	100	8 1/2	11 1/2
	125 (52-2)	90	10 1/2	14
	175 (79.4)	80	8	-----
	175 (79.4)	1500	8	-----

NOTA:  $\mu$  pressão em micron  
----- dados não verificados

Tabela 14 Tempo de secagem para camarão (hr)

Extraído de Lusk e colab. (56).

Segundo Goldblith e colab (41) a quantidade de água absorvida por crustáceos é notavelmente incrementada com a alta temperatura de congelação (velocidade baixa de congelação). Obviamente que esta congelação lenta produz uma destruição parcial da estrutura pela formação de cristais grandes, havendo uma maior absorção de água pelo produto durante a rehidratação.

Entretanto esta absorção de água absorvê-la no produto, não é um critério objetivo de qualidade sobre o julgamento dos parâmetros ótimos dos processos. Pode-se fundamentar, logo que a avaliação organoléptica indica que produtos congelados a 15 $^{\circ}\text{F}$  (-10 $^{\circ}\text{C}$ ) foi demasiado úmido e que os congelados a 0 $^{\circ}\text{F}$  (-18 $^{\circ}\text{C}$ ) e -40 $^{\circ}\text{F}$  (-40 $^{\circ}\text{C}$ ) foram considerados mais aceitáveis.

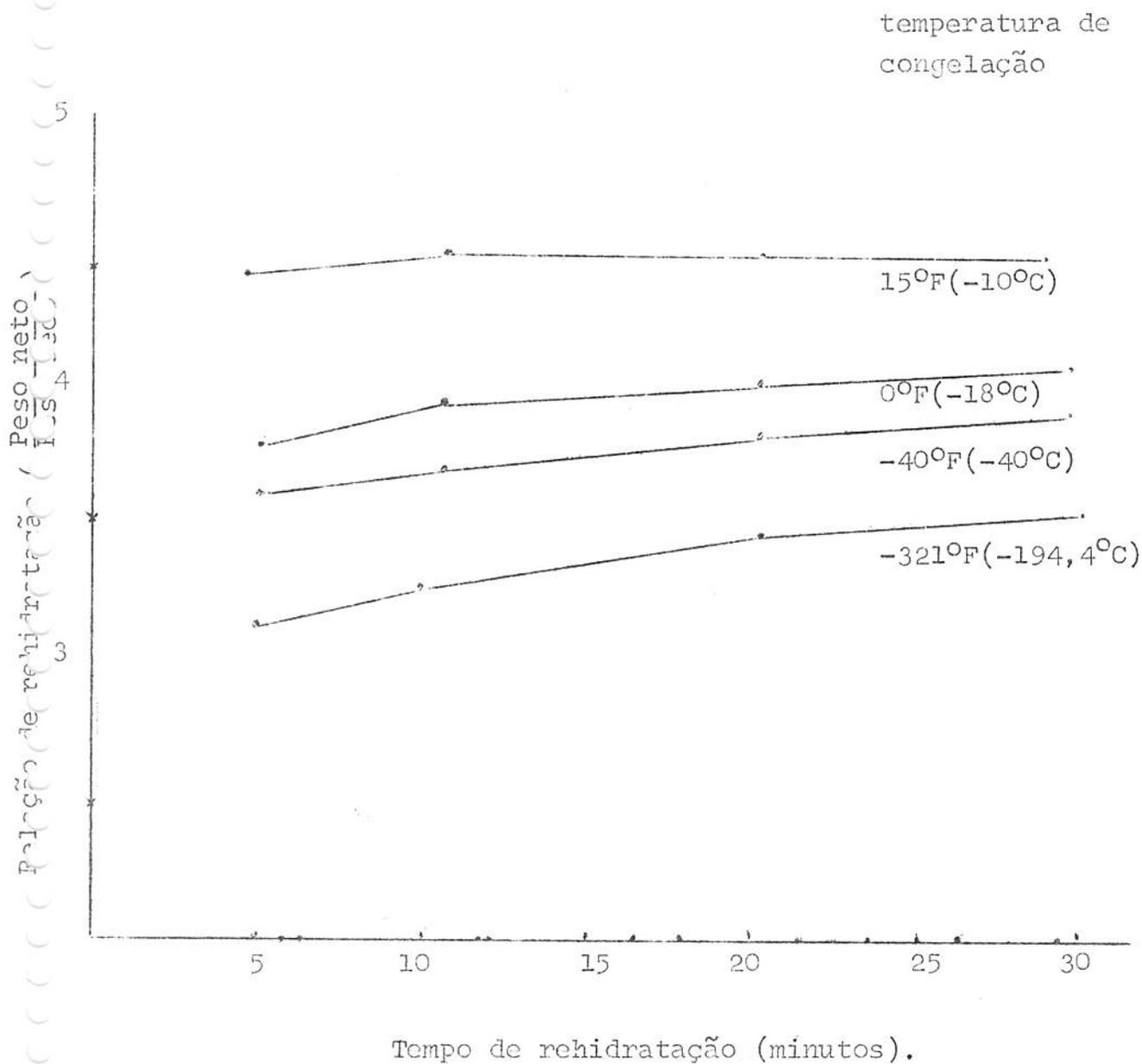


Fig. 16 - Velocidade de rehidratação do camarão liofilizado como uma função da temperatura de congelamento.

Extraído de Goldblith e colab (41).

## 2. Secagem primária

Uma vez congelado o produto ele é colocado na câmara, e aplica-se vácuo até que se inicie a sublimação. Como a formação de vapor necessita calor, é necessário aplicá-la para que a temperatura não diminua. A temperatura deve ser regulada para não ultrapassar o ponto de fusão do produto. Esta operação tem a finalidade de eliminar a água livre do produto.

Esta água se encontra nos microporos ou microcapilares entre as moléculas das fibrilas de estrutura fibrosa e membrana da célula; é retida nos tecidos pela pressão osmótica e por absorção da estrutura, as quais são uma rede de membrana de proteínas e fibras. Estruturalmente a água livre está presente nos espaços intercelulares (onde é retida por forças capilares) e no plasma do sangue e linfa (84).

A temperatura que se usa nesta etapa de secagem para a liofilização do camarão pode ser observada no gráfico seguinte.

Analisando o gráfico seguinte, o produto é introduzido na câmara a 20°F (-7°C) com uma porcentagem de umidade de 100%. A pressão aplicada foi, segundo Lusk e Colab. (56) 1.5 mm Hg. A pressão é reduzida com a finalidade de, quando se aplicar calor, a água em forma de cristais de gelo possa sublimar-se. A temperatura aplicada na câmara no início da liofilização foi 80°F (27°C).

No início do processo a temperatura da superfície do produto vai aumentando e no centro diminuindo. Isto pode ser devido ao fato de que o centro cede calor para a superfície, mas logo aumenta até chegar a 125°F (52.2°C). O tempo que leva de 80°F a 125°F deve ser menor que 1 h, havendo-se evaporado quase 10% de água em forma de gelo. Portanto, poder-se-ia dizer que a faixa de temperatura de 80°F a 125°F corresponde à secagem primária.

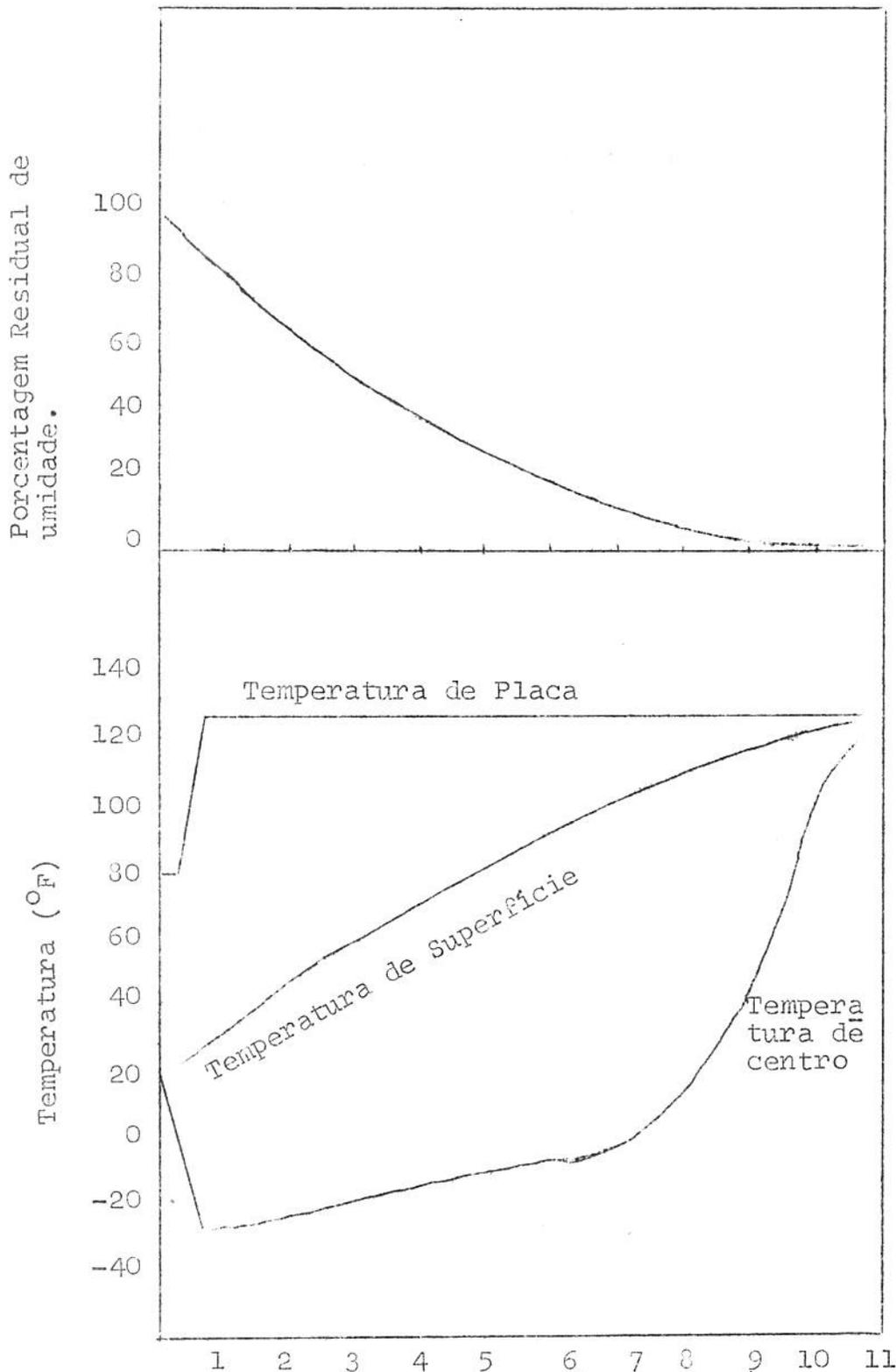


Figura 17 - Curva de liofilização para 21/25 de camarão cru liofilizado a 125°F(52.2°C)

Extraído de Lusk e colab (56).

### 3. Secagem secundária

Esta etapa tem a finalidade de eliminar a água retida no produto (água ligada, difícil de evaporar) para o que se usam, relativamente, altas temperaturas, já que a mesma encontra unida fortemente a moléculas de natureza hidrofílica, principálmente por proteína na forma de gel, ou de sistemas de fluido coloidal (84). A pressão dentro da câmara é mantida constante e, desta maneira, pode-se elevar a temperatura para que a água "quí-mica" seja evaporada sem prejudicar o produto.

Lusk e colab. (56) nessa secagem, usaram temperaturas de 125°F (52.2°C) e 175°F (79.7°C) e o vácuo foi rompido com nitrogênio, já que por ser inerte não oxida as gorduras, nem afeta o pigmento astaceno. Tais temperaturas foram mantidas constantes durante essa etapa. Os tempos de secagem a 125°F (52.2°C) foram de 10 h. e 8 h. a 175°F (79.7) e o resíduo de umidade neste experimento não foi calculado, mas se supõe que não deve ser maior que 2% (41).

Moorjani e colab. (59) usaram como temperatura de placa (secagem secundária) 45°C e, uma pressão de 0.3 mm Hg, obtiveram um resíduo de umidade de 3% sendo a duração da secagem de 12 horas.

Das 3 temperaturas anteriores, a de 175°F (79.7°C) foi a que apresentou o tempo mais curto para liofilizar o camarão; isto não quer dizer que se deve aumentar a temperatura nessa etapa, pois se sabe que um aumento de energia pode desnaturar as proteínas e causar perdas de outros componentes (vitaminas, minerais e astaceno).

Karel e colab (49) investigando o efeito da temperatura da placa (no camarão), encontraram que a temperatura de 125°F é a que preservou a qualidade e retenção do pigmento (astaceno) (figura nº 9).

Estas temperaturas podem causar alterações histológicas que dificultam sua reconstituição ao ser rehidratado.

Goldblith e colab. (41) estudaram os efeitos da temperatura de placa na absorção do camarão liofilizado, preparados sob duas condições de secagem: 175°F (79.7°C) e 125°F (52.2°C) e descobriram que a rehidratação não é somente função da temperatura da placa mas também de: temperatura de congelação do produto; temperatura e tempo de cozimento; e, temperatura de rehidratação, quando o crustáceo, depois de ser liofilizado, é submergido em água.

a) O efeito da temperatura de congelação do produto está explicado na página (86).

b) A rehidratação é uma função do tempo e da temperatura de cozimento, isto é quando o produto depois de liofilizado é introduzido em água quente por muito tempo pode-se produzir uma desnaturação de proteína e portanto uma menor capacidade de retenção de água.

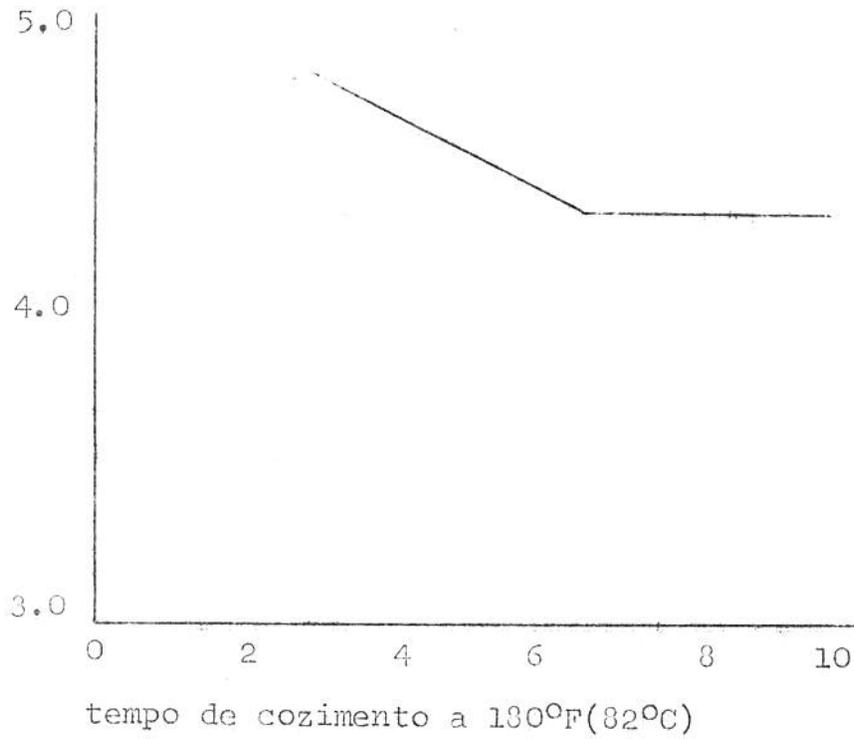
Goldblith e colab. (41) por exemplo, afirmam que quando a amostra cozida por 3 minutos a 100°C congelada - 18°C e depois liofilizada, no momento da rehidratação, à temperatura de 21°C, a relação de rehidratação do produto quando submetido a temperatura de placa de 52.2°C foi de 4,29, enquanto que para 80°C foi de apenas 4.0. Ver gráfico seguinte, (fig. 18).

c) Efeito da temperatura da água de rehidratação do camarão.

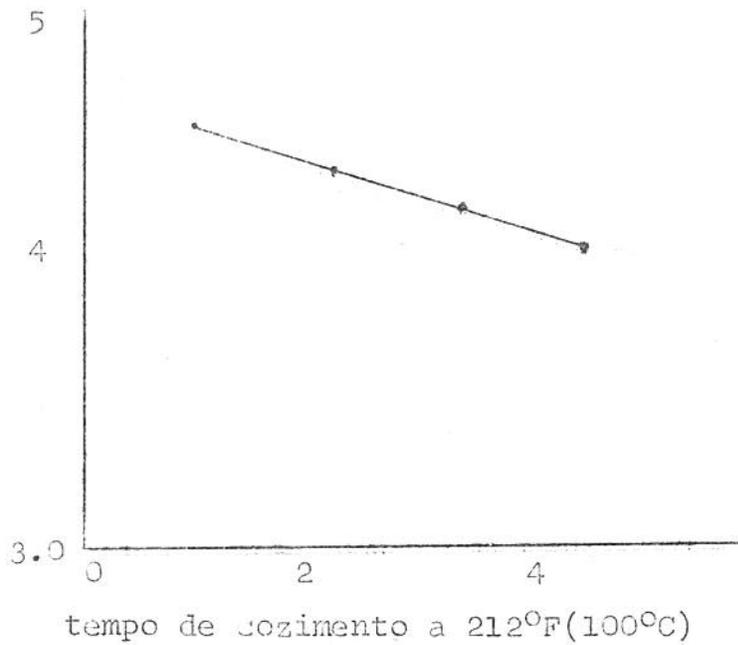
Goldblith (41) encontrou que à medida que aumenta a temperatura da água para rehidratação do crustáceo, a absorção de água no camarão se reduz. Isto pode ser devido a uma desnaturação de proteínas o que explica o dito fenômeno já que a uma baixa temperatura a absorção de água é maior.

No gráfico da página 93, observa-se a relação de absorção de água VS. temperatura, (fig. 19).

Relação de rehidratação depois de 30 minutos (Peso úmido/peso seco)



Relação de rehidratação depois de 30 minutos (Peso úmido/peso seco)



Extraído de H. Goldblith (41)

Fig. nº 13 - Rehidratação do camarão liofilizado em função do tempo e temperatura de cozimento.

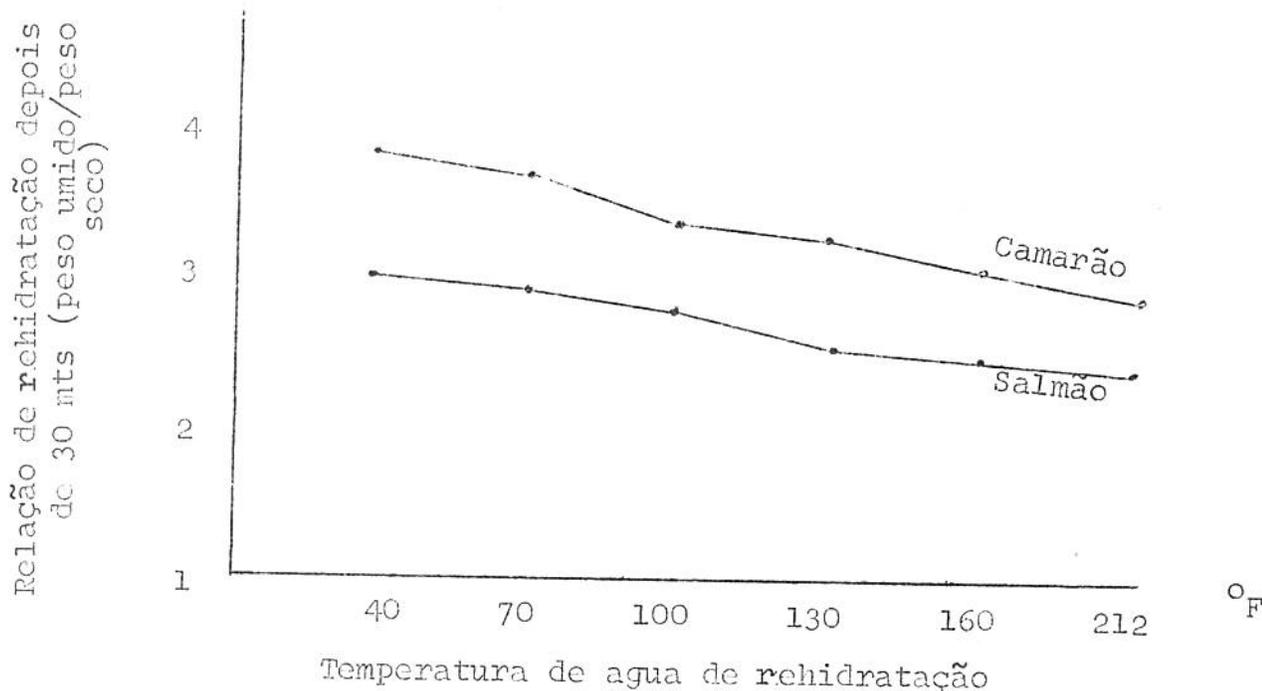


Figura 19 - Rehidratação de camarão e salmão liofilizados em função da temperatura da água.

Extraído de - Goldblith e colab (41).

O mesmo autor diz que a velocidade de rehidratação do material liofilizado é uma boa medida de processamento, como também de aceitação do produto.

#### 6.4. Armazenamento

No armazenamento descobriu-se que o pigmento astaceno do camarão é destruído por temperaturas altas pois Karel e colab. (49) encontraram que quando o crustáceo foi armazenado em ar atmosférico, o pigmento foi todo oxidado, ou branqueado, depois de uma semana à temperatura de 68° F (20°C) e 98° F (34.4°C). Problema foi solucionado em atmosfera de nitrogênio. O astaceno pode ser degradado por oxidação de ácidos graxos insaturados, como foi explicado anteriormente, e isto pode ser evitado pelo uso de anti-oxidantes.

## 5. Características mais importantes de processos de liofilização

Os alimentos liofilizados tem geralmente melhor gosto do que os outros alimentos secados. Além disso, rehidratam-se mais rapidamente do que a maioria dos alimentos dessecados de maneira convencional.

Os alimentos liofilizados têm as vantagens de todos os alimentos dessecados com a diferença de serem mais volumosos, são armazenados e transportados sem refrigeração, são leves e podem ser guardados por tempo indeterminado. Essas vantagens, aliadas à capacidade de retenção do paladar, proporcionam aos alimentos liofilizados uma posição destacável entre todos os produtos processados.

Outras vantagens são: pode-se remover a umidade dos produtos a baixas temperaturas sem afetar a qualidade dos alimentos; os produtos liofilizados são extremamente porosos e rapidamente absorvem água durante a rehidratação; os componentes voláteis e sabores são retidos durante o processo (5).

Segundo Catson e colab. (15), camarões liofilizados enviados do Texas, em barco a Chicago, sofriam onus de frete de \$1,65 por 100 lbs. (ou 500 lbs. quando reconstituído), enquanto que camarões congelados e enviados ao mesmo lugar custavam \$24,20 por 100 lbs., além do custo de armazenagem de 50 centavos (dolar) por 100 lbs., para o primeiro mês. Conseqüentemente, os camarões podiam ser vendidos a 14 centavos (dolar) por lbs. mais barato que o produto congelado, obtendo-se lucro adequado.

A maior desvantagem do processo de liofilização é o alto custo de remoção da água durante a secagem e o longo período de tempo requerido na operação. Outro problema, é a falta de maior informação sobre os efeitos do processo sob a qualidade de muitos alimentos.

CAPÍTULO III

PRESERVAÇÃO DOS PIGMENTOS DO CAMARÃO DURANTE OS PROCESSOS DE REFRIGERAÇÃO, CONGELAÇÃO E LIOFILIZAÇÃO

Nesse item serão estudadas as formas de evitar a oxidação da astaxantina e hemocianina, bem como a formação do pigmento negro (melanina) nos crustáceos.

1. PRESERVAÇÃO DA ASTAXANTINA

A oxidação deste pigmento durante a refrigeração pode ser significativamente inibida, se os seguintes fatores forem observados:

(a) depois da captura, o produto não deve ficar exposto à temperatura ambiente, mormente sob os raios solares. A página 25-40 explica-se o efeito de cada fator;

(b) temperatura ideal de armazenamento à temperatura ao redor de 0.C ou inferior;

(c) proteger o produto sempre que possível, em sacos plásticos para impedir o contacto entre o produto e o oxigênio.

A perda de astaxantina no armazenamento congelado, pode ser reduzida, se antes de congelar o produto, o mesmo for tratado com agentes antioxidantes para proteger os ácidos graxos insaturados presentes nos crustáceos. Na tabela 7 (pág.33) citam-se os antioxidantes de maior aplicação na indústria de camarão congelado. Dentre estes compostos, os mais eficazes na prevenção à rancidificação do produto e, conseqüentemente a oxidação do pigmento, são o ácido ascorbico, em concentração de 0.1% e fumaça líquida (\*) em concentração de 1,5%, sendo maior a efetividade da retenção do pigmento quando se misturam ambos. A retenção do pigmento no crustáceo pode ser incrementada envolvendo-se o produto em papel celofane vermelho para impedir a ação dos raios visíveis e ultravioletas (2).

A perda de astaxantina durante a liofilização é reduzida através do emprêgo de atmosfera de nitrogênio, tanto na câmara de secagem como no armazenamento (figura 7 e 8, página 37-38). A temperatura de 52.1°C na câmara de secagem tem sido a mais recomendada para a preservação do pigmento do crustáceo (49).

## 2. MELANINA

O fenômeno da melanose no crustáceo pode ser evitado em ausência de oxigênio e redução do pH através da aplicação de ácidos orgânicos, como o cítrico (47, 82) e o láctico (10). Agentes redutores e quelatos e com temperaturas reduzidas e altas eliminam a melanose.

A presença de oxigênio durante a refrigeração e a congelação é essencial para a ativação da tirosinase que, ao interagir com a tirosina, dá lugar à formação da mancha negra no crustáceo. A presença do oxigênio no processamento pode ser reduzido colocando-se o produto em embalagens impermeáveis ao oxigênio e ao vapor de água. A ausência do oxigênio no produto retarda as reações químicas e enzimáticas da mesma, como a oxidação das gorduras e a ativação da lipoxidase.

A redução do pH a menos de 6, previne a atividade catalítica da tirosinase sobre a tirosina.

Os agentes redutores previnem a oxidação da tirosina à dopa (3,4 deshidroxifenilalanina). Segundo Lerner e colab. (52) o dopa é o substrato essencial da enzima, pois se comprovou que quando o mesmo não se forma no camarão a melanina é inibida no produto.

Alford e colab (1), conseguiram evitar a melanose no crustáceo com concentração de bissulfito de sódio da ordem de 1.01%. Faulkner e colab (27) empregando sulfito de sódio, em concentração de 1%, conseguiram retardar a formação da melanose. Tal tratamento, além de reduzir a dopa à tirosina, reduziu o pH do meio. Na tabela seguinte apresenta-se o efeito do sulfito de sódio sobre a produção da melanose.

TABELA Nº 15

Efeito de SC<sub>2</sub> sobre a mancha negra do camarão refrigerado com cabeça

Número de Experimentos	Tempo de armazenamento	Soluções usadas para cobrir camarão	pH	Observações finais do período de armazenamento Transmitância a 420 mμ Aparência da casca refrigerada (ca)	
I	16 horas	Água do mar 1% SO <sub>2</sub> 0,1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +0,1% SO <sub>2</sub>	8,5	28	negro
			6,2	60	ótima proteção
			4,4	89	boa proteção
II	24 horas	Água do mar 0,1% SO <sub>2</sub> 0,1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +0,1% SO <sub>2</sub>	7,75	45	negro
			7,7	33	Leve proteção
			5,8	65	boa proteção
III	*	Água do mar 0,1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% SO <sub>2</sub> 0,1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> +0,1% SO <sub>2</sub>	7,8	1	muito negro
			4,4	81	Leve proteção
			6,4	55	Leve proteção
			5,1	85	boa proteção

Extraído de: Faulkner e Col (17)

Nota \* : Não expõem o tempo.

Reduziu-se também a produção da mancha negra e a contagem bacteriana no crustáceo pela mistura de clorotetraciclina em concentração de 20 p.p.m e ácido iso-ascórbico em concentração de 500 p.p.m. O ácido iso-ascórbico opera na inibição da melanose reduzindo o composto dopa à tirosina  $\alpha$ , qual é substrato-essencial para a tirosinase (57). Na tabela abaixo apresentamos o efeito da clorotetraciclina e ácido iso-ascórbico sobre a melanose no crustáceo.

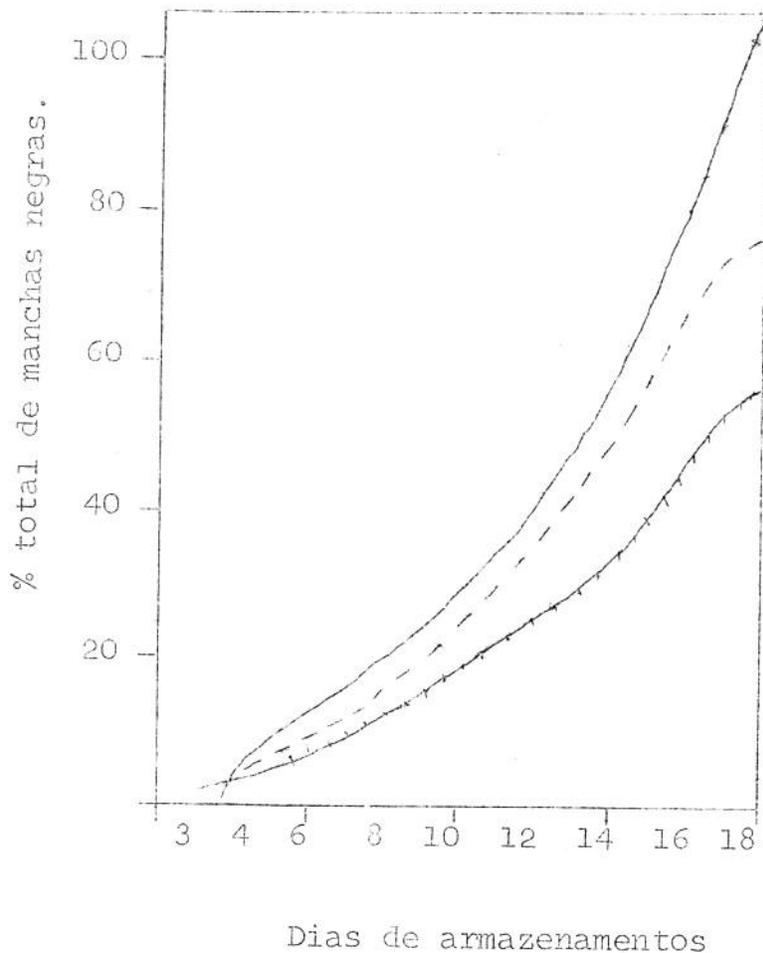
Horas de armazenamento à temperatura ambiente (26-29°C)	Tratamentos	Dias de armazenamento em gelo		
		0	7	15
0	submerso em água	0%	53%	77%
0	clorotetraciclina+ácido iso-ascórbico	0%	0%	47%
2	submerso em água	0%	68%	100%
2	clorotetraciclina + ácido isóascórbico	0%	36%	68%

Tabela 16:

Efeito de clorotetraciclina-isoascorbico sobre o total da mancha negra.

Extraída de Fieger e colab. (27).

Soluções de bissulfito de sódio em concentrações de 1000 a 1500 p.p.m. adicionadas ao gelo não só evitam a formação da melanose, como ainda podem descorar algumas manchas pretas - formadas no crustáceo. Em tais concentrações a melanose no produto foi inibida durante 15 dias (27). O bissulfito empregado conjuntamente com clorotetraciclina, na prevenção da melanose, resultou deficiente. A concentração de bissulfato de sódio foi de 1000 p.p.m. e a do antibiótico 5 p.p.m. Na figura seguinte podem ser observados os efeitos do gelo comercial, gelo com clorotetraciclina e gelo com bissulfito de sódio . (fig. 20)



Curvas \_\_\_\_\_ significa gelo comercial  
 - - - - - gelo comercial + CTC (5 p.p.m.)  
 ..... gelo comercial + bissulfito de sódio  
 (1000 p.p.m.)

Fig. 20 - Efeito comparativo entre gelo comercial, gelo com C.T.C. e gelo com bissulfito sobre a porcentagem total de melanose durante o período de armazenamento do camarão.

Extraída de: Fieger e colab. (30).

Também tem sido empregadas soluções de cloreto de sódio em concentração de 20.000 p.p.m. e cloreto de cálcio em concentração de 2.000 p.p.m. com o objetivo de prevenir a melanose no produto. Observou-se que além de serem ineficientes para evitar a produção do pigmento negro, parece ser que aceleram a oxidação das gorduras presentes no produto.

Na fig. abaixo, apresentamos os efeitos do gelo comercial, gelo mais clorotetraciclina e gelo com a solução de cloretos de sódio e cálcio. (fig 21)

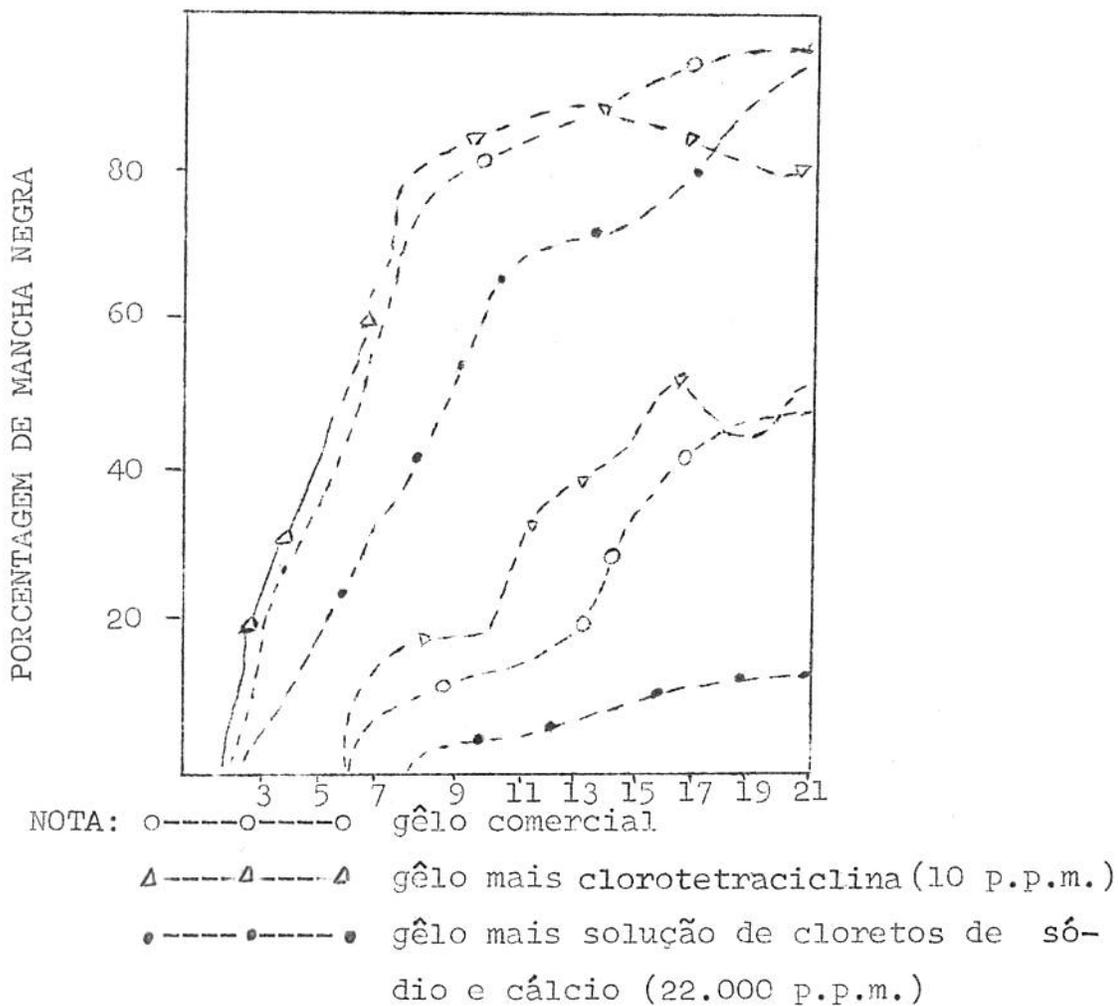


Fig. 21 - Desenvolvimento severo e total de mancha negra sobre o camarão armazenado em vários tipos de gêlos.

Extraído de: Fieger e colab. (30)

Capont (14), demonstrou que introduzindo-se camarões em solução de bissulfito de sódio em concentração de 1,25% em água de mar durante um minuto, previne-se a mancha preta no produto.

A aplicação de agentes quelantes na indústria do camarão tem sido usada para inibir a produção da melanose. Os agentes quelantes formam com o cobre da tirosinase um complexo estável, o que impede que este metal possa induzir a ativação da mesma.

Dentre os compostos mais empregados, para prevenir a coloração negra do produto, citam-se o ácido cítrico e o EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético). A concentração de ácido-cítrico na prevenção da melanose varia de 0.5 a 1%. Esse ácido, não só atua como agente quelante como também baixa o pH do produto.

O ácido cítrico combinado com o ácido ascórbico, também se emprega na inibição da melanose evitando que o fenômeno o corra em período de 5 dias.

Varona (82) empregando condições extremas de proteção , tal como mistura de ácido cítrico em concentração de 19.6% , metabissulfito potássico em concentração de 30% e EDTA em concentração de 0.4%, evitou a melanose no produto.

Berberian e colab. (10), adicionando ácido láctico (0,6%) ao gelo, salienta que o aparecimento da melanina foi reduzido já que o ácido láctico reduz o pH.

Na figura seguinte apresentamos o efeito do ácido láctico sobre o pH do crustáceo. (fig. 22)

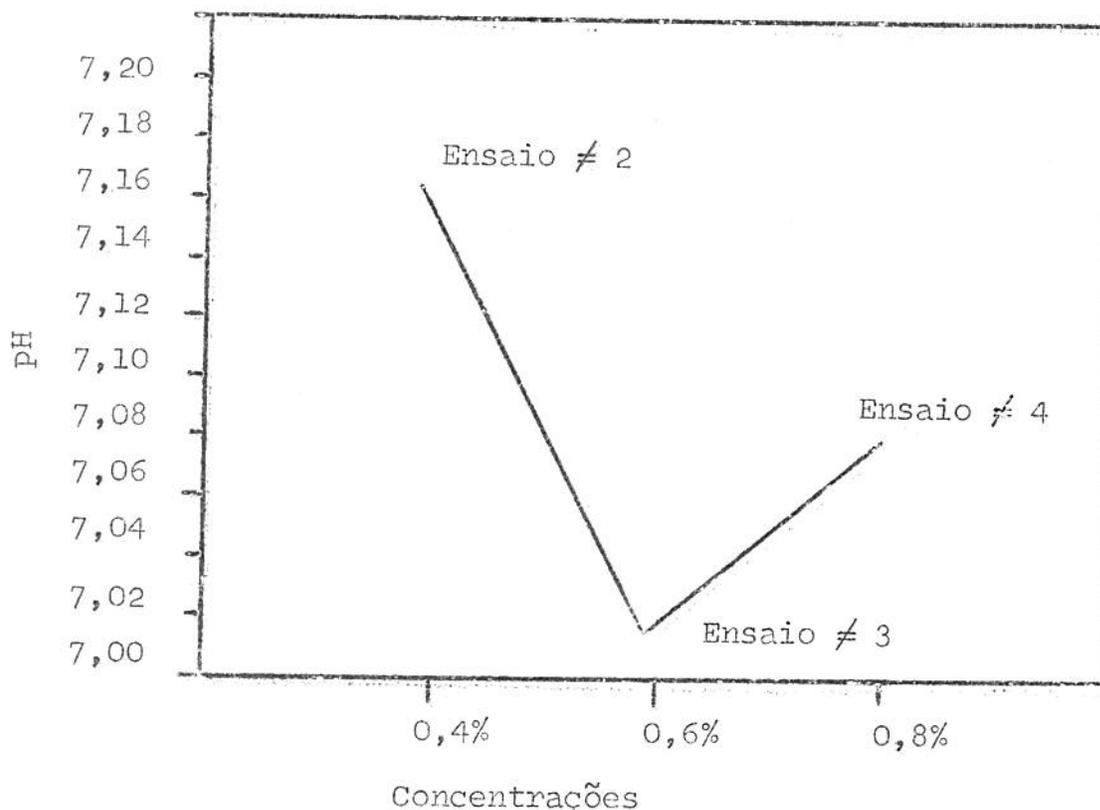


Figura 22 - Curva de índices médios dos ensaios 2, 3 e 4 apresentando o pico máximo (para a acidês) no ensaio 3, na concentração de 0,6% de ácido láctico.

Extraído de : Berberian (10)

### 3. HEMOCIANINA:

Para evitar a oxidação da hemocianina no camarão, tanto na refrigeração como na congelação, pode-se empregar o metodo de Osakabe (61), que consiste em remover o pigmento do sangue do mesmo. Lunderberg, citado por Furia (35), diz que a oxidação da cuproproteina pode ser evitada pelo bloqueamento com EDTA, em concentração de 0.5%.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

### ASTAXANTINA

A presença do pigmento no camarão tem papel importante na comercialização do produto já que a cor, entre outros fatores, determina o seu valor.

A formação da astaxantina no crustáceo se deve principalmente a hábitos alimentares, pois encontrou-se em diversos experimentos, que animais isentos de certos alimentos ricos em carotenoides, não produziam a cor vermelha. Contudo, estudos posteriores sobre a formação da astaxantina nos animais, revelaram que alguns tinham a capacidade de sintetizar o pigmento (79). Na página 6 se expõe um possível mecanismo, pelo qual a astaxantina poderia ser sintetizada através a oxidação do B-caroteno. Tal mecanismo constitui tentativa de explicação de como se pode formar o pigmento em alguns animais. Não explica porém que fatores são necessários para que se realize a síntese, e daí a necessidade de estudos mais aprofundados a respeito da formação da astaxantina no organismo animal.

### Degradação da astaxantina na refrigeração

A oxidação do pigmento está relacionada a uma manipulação inadequada depois da captura do crustáceo, principalmente quando o mesmo for exposto à temperatura ambiente, o que facilita a sua oxidação. A presença do oxigênio do ar e os efeitos dos raios solares, degradam o caroteno rapidamente. Portanto, para prevenir a descoloração da astaxantina após a captura do crustáceo, deve o mesmo ser armazenado imediatamente.

A perda da astaxantina no armazenamento é devido, principalmente, à temperatura inadequada de refrigeração (vide figura 5). Nesta figura se observa que, quanto mais baixa é a temperatura, melhor se conserva o pigmento. Isto implica dizer que

a degradação da astaxantina na refrigeração é devido a uma deficiência técnica. Daí, pode-se concluir que a oxidação do pigmento realmente pode ser reduzida, se o produto for armazenado rapidamente à temperatura de 0°C ou menor.

Em relação ao efeito do pH sobre o pigmento, não há estudo específico que revele qual a relação pH/pigmento que apresenta a máxima estabilidade.

#### Oxidação da astaxantina em congelação

A degradação da astaxantina na congelação pode ser devido tanto a presença de oxigênio, quando o produto é congelado sem embalagem, como também pelo fenômeno "Freeze-burn", ou seja queima pela congelação. Recomenda-se congelação rápida.

As perdas do pigmento na congelação atribuem-se à oxidação das gorduras presentes no produto, devido à formação de radicais peróxidos e hidroperóxidos, que ao interagir com o caroteno produzem a descoloração. A oxidação das gorduras insaturadas pode ser acelerada pela luz, por pro-oxidantes (sais, metais), como também pela enzima lipoxidase. A oxidação da astaxantina no processo, evita-se com o emprego de agentes antioxidantes (vide tabela 7, página 33). Nessa tabela expõem-se as concentrações de cada um dos compostos empregados na proteção do pigmento. O possível mecanismo pelo qual estes radicais oxidam o pigmento, está na página 34.

Outra forma pela qual se pode evitar a oxidação do pigmento, se faz armazenando o crustáceo em atmosfera de nitrogênio.

#### Degradação da astaxantina na liofilização

A perda da astaxantina neste processo em sido atribuída somente à presença de oxigênio durante a etapa de secagem e armazenamento (49). Dentro da câmara, existe uma mínima concentração de oxigênio de 2.5%, o que implica que esse resíduo é o fator pelo qual se degrada o pigmento (figura 6, pág.31). Diver

tos experimentos tem sido feitos com o objetivo de reduzir tal concentração na câmara de secagem. Menores porcentagens de ar prejudicam a qualidade do produto, devido a uma desidratação excessiva do mesmo.

À temperatura de secagem a que o crustáceo é submetido (vide página 36), parece que não se produz perda do pigmento durante o processo de liofilização, ainda que aparentemente, exista uma mínima degradação. Comprovou-se, no entanto, que isso se deve a uma autoxidação da caroteno-proteína, pela presença do oxigênio. Quando se liofilizou o produto em atmosfera de nitrogênio, a perda do pigmento se reduziu ao mínimo.

A temperatura de 68°F (20°C) de armazenamento do crustáceo resultou ser o problema mais importante na degradação da astaxantina, apesar da atmosfera de nitrogênio, admitindo-se que temperaturas mais baixas de armazenamento preservem melhor o pigmento.

Do exposto pode-se concluir que a única maneira de reduzir a perda da astaxantina no processo de liofilização se dá através de atmosfera de nitrogênio na câmara de secagem e de armazenamento.

### MELANINA

Na industrialização do camarão, a formação do pigmento negro (melanina) constitui o mais importante problema. A formação da melanina no crustáceo, segundo critério sanitário, não oferece perigo algum, senão que sua cor dá ao produto um aspecto bastante desagradável que afeta a comercialização do mesmo. A melanose criou, de fato, uma série de problemas técnico-industriais, como também econômicos. A solução desses problemas, por meio de procedimento aceitável pela Saúde Pública, terá muita importância.

A formação de melanina no crustáceo depende de três fatores: da presença da enzima tirosinase, da tirosina ou do composto dopa (3,4-dihidroxi-fenilalanina) e da presença de cobre

na enzima. O mecanismo pelo qual a tirosinase degrada a tirosina ou dopa, está bastante elucidado, exceto algumas reações que para alguns autores, são de origem enzimática e, para outros, sucedem espontaneas. Dentre elas, é digno de menção a oxidação do composto dopa-quinona a ácido 5,6-deshidroxi-indol - 2 -carboxílico a dopacromo (2-carboxi-2,3-deshidro indol 5,6 quinona)

### Formação da melanina na refrigeração e congelação

A formação da melanina no camarão, se deve principalmente a falhas técnicas na preservação do produto refrigerado e, na realidade, diversos estudos demonstram que, quando o crustáceo é exposto na coberta do barco, durante tempo demasiado longo, a produção do pigmento negro aparece posteriormente. Isto se deve a exposição do camarão ao oxigênio, à umidade, raios solares, temperatura ambiente, alguns deles responsáveis pela ativação da tirosinase sobre a tirosina. O pH do crustáceo tem sido outro fator que produz, na refrigeração, a melanose. Valores de pH acima de 7,7, indicam produto inapto para consumo, por sua qualidade. A temperatura de armazenamento do camarão certamente, influirá no desenvolvimento da melanose; acima de 0°C, há aumento da atividade catalítica da tirosinase sobre o dopa.

Ainda que a melanose se observe muito pouco na congelação, já que antes de ser congelado o crustáceo, este é adequadamente tratado com substancias inibidoras da ação enzimática. Porém, muitas vezes, apesar de se lhe adicionarem substâncias preservativas, a melanina se forma. Isto poderia ser atribuído a concentrações ineficientes dos mesmos.

Agentes redutores e quelantes inibem mancha negra no crustáceo. Os redutores previnem a formação do dopa, substrato especial para a ativação da enzima. Estes compostos foram aplicados em duas formas: 1) adicionando-as ao gelo; 2) em solução. Gelo com bissulfito de sodio tem sido muito eficaz na inibição da melanose no camarão (vide pagina 100). O emprego de gelo com ácido ascórbico- ácido cítrico, resultou excelente. Submergin

do-se o produto em soluções de bissulfito de sódio e ácido ascórbico, conseguiu-se também prevenir a melanose. O ácido ascórbico, além de prevenir a formação do dopa, reduz o pH do camarão.

A ação dos quelantes, consiste em formar complexo estável com o cobre da tirosinase. Nesta, o cobre se acha preso ao composto por ligações coordenadas, passando de cobre divalente ( $\text{Cu}^{++}$ ) a cobre monovalente ( $\text{Cu}^+$ ). A efetividade dos agentes sequestradores depende do pH do produto. No caso do camarão, recomenda-se meio ácido, já que em valores acima de 7, os grupos hidroxilos competem com os quelantes pelo ion cobre.

Entre os compostos quelantes, os de maior aplicação na indústria do camarão são o ácido cítrico e o EDTA (ácido etileno diamino-tetraacético). As concentrações de ácido cítrico para prevenir a melanose no camarão, não têm limite senão nas características organolépticas. O EDTA é bastante efetivo na inibição da melanose. Seu uso ainda oferece dúvidas, por ser composto novo, na preservação dos alimentos.

A clorotetraciclina, só ou de mistura com bissulfito de sódio, também tem sido usada para prevenir a melanose. É mais efetiva na redução da flora microbiana do crustáceo. Os cloretos de sódio e de cálcio além de ineficientes na diminuição da mancha negra, atuam como prooxidantes das gorduras presentes.

### HEMOCIANINA

A degradação da hemocianina no camarão, quando submetido aos processos industriais, está pouco estudada, como se observa neste trabalho bibliográfico (61).

A presença de cobre na molécula da proteína, parece exercer uma atividade catalítica responsável da oxidação do pigmento, tanto na refrigeração como na congelação. Neste último caso a degradação da hemocianina pode ser devido à congelação lenta, deixando livre o sangue do crustáceo à ação do oxigênio, da luz e dos microorganismos.

Também no caso desse tem-se aplicado agentes quelantes como na inibição de melanose. O EDTA em concentração de 0,5% e ácido cítrico a 0.5 ou 1%, sequestram o cobre da sua estrutura. Entretanto, Osakabe (61) afirma que a oxidação da hemocianina pode ser evitada eliminando-se o sangue do crustáceo. Os estudos da degradação da hemocianina nos processos de refrigeração e congelamento, ainda não tiveram a importância devida.

BIBLIOGRAFIA

1. ALFORD, J. A. & FIEGER, E. A. - The nonmicrobial nature of black spots on ice-packed shrimp. Food Technol. 6:217, 1952.
2. AMANOK; BITON, M. & TSUKUDA, N. - Discoloration of tuna and red-skin during frozen storage. In: KRUGER, R Freezing and irradiation of fish. London, Fishing News. FAO, 1961 p.161.
3. ANGELCOLA, E. - Automatic contact plate freezing. In: American Society of Heating, Refrigerating and Air-conditioning Engineers, 1967. p.31.32.
4. ASHRAE GUIDE AND DATA BOOK APPLICATION. - Fishery products 1971, p.323.
5. ASHRAE GUIDE AND DATA BOOK APPLICATION. - Theories and methods of chilling, freezing and freeze-dehydration, 1971, p.243-274.
6. BAILEY, M. E.- Physico-chemical properties of the enzyme involved in shrimp melanogenesis. J.Food. Res. 25:557, 1960.
7. BALL, E. E.- A Blue chromoprotein found in the eggs of the goose-barnacle. J. Biol. Chem. 152:627, 1944.
8. BALTAR, P.- El processo de la salazón de anchoas. Industria Pesquera, nº 1052, p. 67, 1971.
9. BEHM, C. R. & NELSON, M. J.- The activity of tirosinase toward phenol. J. Am. Chem. Soc. 66:709, 1944.
10. BERBERIAN, A.; SABOYA, T. R. & LEÃO, R. L.- Reação do camarão (*Peneaus brasiliensis*) tratado com ácido láctico. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, nº 42, p. 25-28, 1969.
11. BORENSTEIN, B. & BUNNELL, H. R.- Carotenoids: properties occurrence and utilization in foods. In: Adv. in Food Res. 15:255-259, 1966.

12. BUTTER, B. G. & BERLIN, D. K.- Fundamentals of organic chemistry. New York, Ronalds Press, 1972, p. 800-801.
13. CAMARGO, F. L.- Refrigeração. Em: Curso de tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, O.E.A., 1972, p.85.
14. CAPONT, F. L.- Camarão. Em: Curso de tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, O.E.A., 1971, p.113
15. COTSON, S. & SMITH, D. B.- Freeze drying of foodstuffs. Manchester, Columbine Press, 1963 p. 274.
16. CLAESSION, M. T.- Effect of ultraviolet light (2537A) on Helix pomatia hemocyanin and bobine serum albumin as studied by the changes in the ultraviolet spectrum and sedimentation behavior. Arkiv Kemi, 10: 1-12, 1956. (Chem. Abst. 51: 2910, 1957).
17. CODEA, C.- Cyclization reaction of carotenoids. In: International Union of Pure Applied Chemistry. London, Butterworths, 1969. p. 527. (International symposium, 2)
18. COLLINE, J.- Processing and quality studies of shrimp held in refrigerating sea water and ice. 1. Preliminary observation on machine-peeling characteristics and product quality. Comm. Fisheries Rev., 22 (3):1-5, 1960.
19. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_.4. Interchange of the components in the shrimp; refrigerated sea water system. Comm. Fisheries Rev. 22(7):9-14, 1960.
20. DASSOW, J. A.- Freezing gulf-of-Mexico shrimp at sea. Comm. Fisheries Rev., 16:1-9, 1954.
21. DEUEL, H. J.- The lipids. New York, Academic Press. v.1. p.588.
22. DEULOFEN, V; MORENZA, D. A. & STOPPANI, M. A.- Quimica biológica. 9.ed. España, Ed. Ateneo, 1967, p. 738-740.
23. DOSSAT, J. R.- Principio de refrigeración. México. Ed. Continental, 1971. p. 243.

24. DUGGAN, R. E. & STRASBURGER, L. W.- Indole in shrimp. J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 29:177-180, 1946.
25. ESTABLIER, R.- Estudios sobre los carotenoides de plantas animales marinos. Invo. Pesq. 30:207-209, 1966.
26. FAULKNER, B. M. & WATTS, B. S.- Deteriorative change in frozen shrimp and their inhibition. Food Technol., 12: 632, 1955.
27. \_\_\_\_\_ & HUMM, H. J.- Enzymatic darkening of shrimp Food Research, 19:302. 1954.
28. FIEGER, E. A. & NOVAK, A. F.- Shrimp. In: TRESSLER, D. K. & COPLEY, I. M. The freezing preservation of foods. Westport, Avi Publishing, 1968, v.3. p. 276-284.
- 29: \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ & BAILEY, M; E.- Effect of delayed handling upon shrimp quality during subsequent refrigerated storage. Food Technol., 12:297, 1958.
30. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ - Chemical iced for preservation. Food Technol., 10:578, 1956.
31. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ - Shrimp. In:TRESSLER, D: K. & COPLEY, J. M. The freezing preservation of foods. WEstport. Avi Publishing, 1968, v.2. p.209-213.
32. FISHER, L. R.; KON, S. K. & THOMPSON, S. K.- Vitamins A and carotenoids in certain vertebrates. Studies of seasonal variations in some marine crustacea. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 33: 582-589.
33. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_ - Vitamins A and carotenoids in certain invertebrates. Marine crustacea. J. Mar. Biol. Ass. U. K. 31: p.229-232, 1952
34. FOK, M. H.- Animal biochrome and structural colors. London, University press, 1953, p. 232.
35. FURIA, T. E.- EDTA in food. Food Technol., 18:50, 1964.

47. JOSLYN, A. M. & HEID, L. J.- Food Processing Operations. Westport, Avi Publishing, 1964, v.3. p. 64-65.
48. KARREL, P & JUNKER, R.- Carotenoids. New York, Elsevier Publishing, 1950. p.229-240.
49. KAREL, M; LUSK, E & GOLDBLITH, S. A.- Astacene pigment loss occurring in freeze-dried shrimp and salmon during storage Food Technol., 18:157, 1964.
50. KAREL, M. & GOLDBLITH, S. A.- Processing aspects of freeze dehydration. In: HEID, J. L. & JOSLYN, M. A. Fundamentals of food processing operations, New York, Avi Publishing, 1967, p.369-393.
51. LAUFFER, M. A. & SWABY, L. G.- The size, shape and hydration of lobster hemocyanin. Biol. Bull. 108:290-295. (Biological Abst. 30:22501, 1956)
52. LERNER, A. B. & FITSZPATRICK, T. B. H. Biochemistry of melanin formation. Physiol. Rev., 30:91, 1950.
53. LERNER, A. B.- Metabolism of phenilalanine and tirosine. Adv. in Enzymol. 14:17, 1953.
54. LORENSEN, G. Refrigeração de pescados. IN: Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, O.E.A., 1972, p.23-25.
55. LUNA, G. L.- Cambios quimicos y microbiológicos en la descomposición de camarones (Penaeus brasiliense) Arch. Latino Americano de Nutrición, 21:381, 1971.
56. LUSK, G. & GOLDBLITH, S. A.- Effect of some processing parameter on the rate of freezing drying of shrimp. Food Technol., 20:620, 1965.
57. MASON, S. H. The comparative biochemistry of phenolase complex. Adv. in Enzymol., 16:105, 1955.
58. MONTGOMERY, A. W.; SIDCHU, S. G. & CHRISTIE, M. E.- The Australian prawn-industry; ovality aspects for export prawn. Food Preservation Quartely, 30:45, 1970.

59. MORJANI, M. N. & DANI, N. P.- Textural and reconstititional properties of freeze-dried shrimp. Food Technol. 26:286 1969.
60. MOSSETTI, M. & FERRERO, F.- Influence of vitamin C on the pigment of skin grafts. Minerva dermatol, 7:457-459, 1957. (Chem. Abst. 52:2067, 1958)
61. OSOKABE, I.- The prevention of blue discoloration of frozen crab meat and canned crabs by fractional and low temperature cooking methods. Reito, 36:979-1010, 1961 (Chem. Abst. 56:14676f, 1962).
62. PEDRAJA, R. R.- Change of composition of shrimp and other marine animals during processing. Food Technol. 18:57 1964.
63. PETER, A. J. & MCLANE, T. D.- Storage life of pink in commercial and jacketed cold-storage room. Comm. Fisheries Rev. 21:1-7, 1959.
64. PINKEY, K. G.- Tyrosinase in crustacean blood. J. Exper. Biol., 7:19, 1930. (Chem. Abst. 24:2204, 1930).
65. PLANK, R.- El empleo del frio en la industria de la alimentación. Zaragoza (España), Ed. Reverté, 1963, p. 258.
66. POHLMANN, W.- Manual de técnica frigorífica. Barcelona (España), Ed. Omega, 1971. p.454.
67. PROYECTO DE CODIGO PARA EL PESCADO CONGELADO.- Industria Pesquera, nº 1021: 578-579, 1969.
68. RANKEN, F. B.- Los métodos de congelación en la mar. Industria Pesquera, nº 933:110-115, 1966.
69. RAWLINSON, W. A.- Crystalline hemocyanin: some physical and chemical constants. J. Exper. Biol. Med. Sci. 18:131-140. (Chem. Abst., 34:6952, 1940)
70. REED, E.- Enzymes in food processing. New York, Academic Press, 1966. p.186-187.
71. REY, L.- Traite lyophilization. In: LONCIN, M. & CARBALLO, J. Técnica de la ingeniería alimentaria. Madrid (España) Ed. Dossat, 1965, p. 562-572.

72. ROCHE, J. & DERRIER, Y.- State of dispersion of the hemocyanin of *Cancer pagurus*. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 140:629-631, 1946. (Chem. Abst. 41:5989, 1947)
73. SIMON, J.; LABUZA, L. & KAREL, L.- Computer-aided predictions of food storage stability: oxidative deterioration of a shrimp product. *J. Food Sci.* 36:280, 1971.
74. SINGLETON, V. L.- Common plant phenols other than anthocyanins; contribution to coloration and discoloration. In: CHICHISTER, C. D. *The chemistry of plants pigments*. New York, Academic Press, 1972. p.167-169.
75. SLAVIN, J. W.- Congelamento y almacenamiento frigorifico. In: STANSBY, E. M. *Tecnologia de la Industria Pesquera*. Zaragoza (España), Ed. Acribia, 1967. p.349.
76. STANSBY, M. E.- Change taking place during freezing of fish. In: *The refrigeration of fish, part 3*. USDI, Fish and Wildlife Service, Fisheries Leaflet, 1965, p.429-435.
77. STERN, G. K. & SALOMON, K. J.- On ovoverdin, the carotenoid protein pigment of the eggs in the lobster. *J. Biol. Chem.*, 122:461-470. p.938.
78. SUMMER, J. B. & SUMMER, R. J.- The coupled oxidation of carotenoid and linoleate catalyzed by lipoxidase. *J. Biol. Chem.*, 250:65, 1958.
79. THOMMEN, H. M.- Metabolism. In: ISLER, O.- *Carotenoids*. Basil und Stuttgart, Germany, Birkhäuser Verlag, 1971. p.647.
80. TOOKEY, H. L.; WILSON, R. G.; LOMAR, L. R. & DUTTON, H. J.- Coupled oxidation of carotenoids and linoleate catalyzed by lipoxidase. *J. Biol. Chem.* 250:65, 1958.
81. TRESSLER, K. D.- Food freezing system. In: TRESSLER, K. D.; VAN ARDEL, B. W. & COPLEY, J. M. *The freezing preservation of foods*. Westport, Avi Publishing, 1968, v.1, p. 120-152.

82. VARONA, J. J.- La melanosis post-mortem de la gamba (camarão) Ind. Pes., nº 984, 985, 986: 171-173, 249-250, 1968.
83. WHITE, H. & SMITS, S.- Principio de bioquímica. New York, McGraw-Hill, 1964. p.884.
84. ZAITZEV, V.; KIZEVETTER, I. & LAGUNOV, L.- Fish curing and processing. Moscow, Ed. Mir, 1969. p.207.

= A D E N D O =

- (a) Hcy significa hemocianina, páginas 48, 56, 56.
  
- (b) fumaça líquida é um produto obtido pela destilação destrutiva da madeira, principalmente a noqueira americana. Nos produtos alimentícios atua como agente anti-oxidante quando empregado só e, sinergístico quando adicionado a outro agente, como o ácido ascórbico.

Impresso e Datilografado na

Fundação Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos

Rua Dr. Pelápio Lobo, nº 63 Telefone: 97822

13.100 Campinas - São Paulo - Brasil