

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES DA CARAPAÇA  
DO CAMARÃO E SUA UTILIZAÇÃO EM UM PRODUTO DERIVADO  
DE PESCADO**

EROTEÍDE LEITE DE PINHO

Fortaleza - Ce  
2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EXTRAÇÃO DE PIGMENTOS CAROTENÓIDES DA CARAPAÇA  
DO CAMARÃO E SUA UTILIZAÇÃO EM UM PRODUTO DERIVADO  
DE PESCADO**

EROTEÍDE LEITE DE PINHO  
Engenheira de Alimentos

Dissertação submetida à  
Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Tecnologia de  
Alimentos, como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre  
em Tecnologia de Alimentos, pela  
Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza – Ce  
2001

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Jorge Fernando Fuente Zapata, Ph.D.

---

Prof. Dr. Geraldo Arraes Maia, Ph.D.

---

Elisabeth Mary Cunha da Silva, Ph.D

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por renovar minha vida a cada manhã.

Ao **prof. Dr. Jorge Fernando Fuentes Zapata**, pela orientação e exemplo de profissionalismo.

Aos meus **pais e irmãos**, pelo carinho. Incentivo constante na minha vida.

Ao **Manoel Honório de Brito Neto** pela ajuda, para que este trabalho se concretizasse.

À **Universidade Estadual Vale do Acaraú** pelo apoio financeiro e minha liberação para cursar o mestrado.

À Ind. Inter Frios, na pessoa do Sr. **Teixeira** pelo fornecimento das cascas de camarão utilizadas neste estudo.

À **Dra. Elisabeth Mary Cunha da Silva** pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Carnes e Pescado do Departamento de Tecnologia de Alimentos, **Luís Alves Bitu, Roselúcia Barrozo e Maria Valdenira**.

Ao **peçoal do laboratório de Carotenóides** da Universidade de Campinas, onde foram realizadas as análises de caracterização de pigmentos.

À **profª. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa Cavalcante** pelo apoio na elucidação dos compostos orgânicos.

Aos **colegas** do curso de mestrado, pela amizade

E aos que não foram citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1 – INTRODUÇÃO .....	01
2 – OBJETIVOS .....	03
3 – REVISÃO DA LITERATURA .....	04
3.1 – Estruturas dos carotenóides .....	04
3.2 – Classificação de carotenóides .....	05
3.3 – Funções dos carotenóides .....	08
3.4 – Carotenóides em crustáceos .....	11
3.5 – Degradação de pigmentos carotenóides .....	13
3.6 – Aplicação de carotenóides em alimentos .....	15
4 – MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1 – Descrição do experimento .....	18
4.2 – Matéria-prima .....	18
4.3 – Extração dos pigmentos das carapaças do camarão .....	19
4.4 – Análise dos pigmentos das cascas do camarão .....	21
4.4.1 – Saponificação do extrato .....	21
4.4.2 – Análise espectrofotométrica do extrato pigmentado .....	22
4.4.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	23
4.4.4 – Cromatografia em camada delgada .....	23

4.5 – Uso dos pigmentos no produto alimentar .....	24
4.5.1 – Elaboração do produto .....	24
4.5.2 – Composição Centesimal dos fishbúrgers .....	25
4.5.3 – Medição de cor .....	26
4.6 – Análise estatística .....	26
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1 – Extração .....	28
5.2 – Curvas de absorção espectrofotométrica .....	28
5.3 – Cromatografia líquida de alta eficiência .....	30
5.4 – Cromatografia em camada delgada .....	30
5.5 – Composição centesimal do produto de pescado .....	31
5.6 – Medida de cor .....	32
6 – CONCLUSÕES .....	38
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
ANEXOS .....	44

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>		<b>Pág.</b>
1 -	Formulação dos fishbúrgers	25
2 -	Rfs obtidos da cromatografia em camada delgada de extratos pigmentados de cascas de camarão	30
3 -	Valores da análise de composição centesimal de fishbúrguer de pescado contendo pigmentos de camarão.	31
4 -	Estimativa das médias e intervalos de confiança dos tratamentos em cada tempo para a variável de luminosidade L*	33
5 -	Estimativa das médias e intervalos de confiança dos tratamentos em cada tempo para a variável de intensidade de cor a*	35
6 -	Estimativa das médias e intervalos de confiança dos tratamentos em cada tempo para a variável de intensidade de cor b*.	36

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		Pág.
1 -	Estrutura dos carotenóides (Gross, 1991)	04
2 -	Estruturas químicas de $\alpha$ - caroteno (a), $\beta$ - caroteno (b), $\epsilon$ - caroteno(c) e licopeno (d) (Shahidi et al, 1998)	05
3 -	Atuação dos carotenóides nas doenças (Rodrigues Amaya, 1997)	09
4 -	Carotenóides do tipo xantofila em crustáceos: (a)equinenona, (b)cantaxantina, (c)astaxantina (Shahidi et al,m 1998)	12
5 -	Possível esquema para a degradação de carotenóides (Rodrigues Amaya, 1999)	14
6 -	Homogeneização do extrato pigmentado.	19
7 -	Filtração do extrato pigmentado através de funil de Buchner em frascos de kitassato.	20
8 -	Extrato pigmentado resultante da filtração e posterior concentração	22
9 -	Curva de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides totais extraídos das carapaças de camarão em éter de petróleo	28
10 -	Curva de absorção espectrofotométrica do padrão de astaxantina em éter de petróleo.	29
11 -	Perfil médio dos tratamentos ao longo do tempo para a variável de luminosidade L*.	32
12 -	Perfil médio dos tratamentos ao longo do tempo para a variável de intensidade de cor a*.	34
13 -	Perfil médio dos tratamentos ao longo do tempo para a variável de intensidade de cor b*.	35

## TABELAS ANEXOS

<b>TABELA</b>		<b>Pág.</b>
A1 -	Estatísticas descritivas da variável de luminosidade L*	44
A2 -	Estatísticas descritivas da variável de intensidade de cor a*	44
A3 -	Estatísticas descritivas da variável de intensidade de cor b*	45
A4 -	Análise de variância para a variável de luminosidade L*	47
A5 -	Análise de variância para variável de intensidade de cor a*	47
A6 -	Análise de variância para variável de intensidade de cor b*	47
A7 -	Resultados das comparações entre os tratamentos em cada tempo para luminosidade L*	48
A8 -	Resultados das comparações entre os tratamentos em cada tempo para a variância de intensidade de cor b*	48

## FIGURAS ANEXOS

<b>FIGURA</b>		<b>Pág.</b>
A1 -	Box-plot da variável de luminosidade $L^*$	45
A2 -	Box-plot da variável de intensidade de cor $a^*$	46
A3 -	Box-plot da variável de intensidade de cor $b$	46

## RESUMO

O descarte na indústria de pescado, inclusive o de carapaças de crustáceos, constitui um percentual bastante elevado. Estas cascas são ricas em pigmentos carotenóides, os quais, apresentam um alto valor de pigmentação, sendo corrente em alguns países a extração e posterior utilização dos mesmos em rações. O objetivo deste experimento foi estudar a extração dos pigmentos carotenóides das cascas de camarão e verificar seu potencial de uso como aditivo natural de cor em um produto à base de pescado. Neste estudo foram desenvolvidos testes preliminares para escolha de um método para a extração dos pigmentos optando-se pela extração com solvente. Caracterizou-se os pigmentos extraídos das cascas de camarão e avaliou-se a influência do extrato pigmentado aplicado em um produto à base de pescado, o qual foi embalado à vácuo e sem vácuo e submetido à uma estocagem (-20°C) durante um período de 60 dias. A cor dos produtos foi medida a cada 15 dias no sistema CIE determinando-se os parâmetros de L\*, a\* e b\*. A análise espectrofotométrica do extrato de camarão apresentou produtos de degradação da astaxantina. Os produtos pigmentados com o extrato de camarão e embalados à vácuo apresentaram valores de luminosidade (L\*) menores ( $p < 0,05$ ) que os embalados sem vácuo com 15 e 45 dias de armazenamento. Para o componente de intensidade de cor amarela (b\*) os produtos embalados à vácuo apresentaram valores maiores ( $p < 0,05$ ) no início do armazenamento (0 dias) e menores ( $p < 0,05$ ) com 45 dias de armazenamento, em relação àqueles embalados sem vácuo. Contudo, no período de 60 dias de armazenamento não foi observado efeito significativo da embalagem à vácuo sobre as características de cor dos produtos.

## ABSTRACT

Waste material in the fish industry including the shells from the crustacean, constitute a very high percentage. These shells are rich in carotenoids pigments, which may have a high pigmentation value when used in foods. It is common in some countries the use of the extracted pigments in feeds. The aim of this experiment was to study the process of carotenoids extraction and to verify its pigmenting potential in a minced fish food product. The solvent extraction technique was used after testing other extraction procedures. Extracted pigments were characterized by spectrophotometry. Pigments were then included in the fish formulation. Fish products were packaged with and without vacuum and storage in the dark at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 60 days. The color of the products was measured every 15 days with the CIE system which determines parameters  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ . The spectrophotometry study showed products of degradation of astaxanthin in the shell extract. The luminosity ( $L^*$ ) of the color in products packaged under vacuum was lower ( $p < 0.05$ ) with 15 and 45 days of storage than in those stored without vacuum. Vacuum packaged products showed that with 0 days of storage the yellowness component ( $b^*$ ) was higher ( $p < 0.05$ ) in vacuum packaged products than in those stored without vacuum. The reverse occurring with 45 days of storage. After 60 days frozen storage vacuum packaging did not affect the color characteristics of the fish product.

## 1. INTRODUÇÃO

Carotenóides são substâncias orgânicas denominadas de pigmentos e largamente distribuídas na natureza. Estas substâncias variam de cor, indo do amarelo ao vermelho.

Os animais não estão bioquimicamente capacitados para a biossíntese de carotenóides, mas podem acumular e ou converter precursores que obtêm da dieta, por exemplo o  $\beta$ -caroteno que se transforma em vitamina A (Rodriguez-Amaya, 1997).

Atualmente, têm se dado especial importância ao uso de pigmentos carotenóides como antioxidantes e potenciais aditivos de cor em ração animal para salmonídeos.

Dentre as diversas fontes de carotenóides na natureza, observa-se as espécies de origem marinha, em especial os crustáceos. Estes, tem uma carapaça rica em pigmentos, os mais variados e que podem ser trabalhados como fontes pigmentantes para rações de uso animal ou em alimentos para consumo humano tais como sopas, temperos em pós etc,. Além das espécies marinhas, observa-se também uma variedade de pigmentos nos vegetais, os quais têm sido bastante discutidos pela abundância com que são encontrados na natureza.

No que concerne aos pigmentos presentes no pescado, a astaxantina tem sido apontada como o pigmento predominante em crustáceos (camarão, caranguejo e lagosta), sendo a principal responsável pela coloração vermelho intenso característica dessas espécies após o seu cozimento (Armenta, 1998).

Resíduos de crustáceos gerados na indústria pesqueira inclusive carapaças, representam aproximadamente 70% do total dos desembarques. Alternativamente, podem ser trabalhados para serem incorporados no desenvolvimento de produtos de pescado mais atraentes (Mandeville et al, 1991).

Em face à realidade de que os resíduos de crustáceos causam problemas no mundo industrializado, a utilização destes é a melhor saída para minimizar o problema de poluição, além de aproveitar melhor seu processamento. Da extração dos mesmos podem ser obtidos pigmentos para serem incorporados à ração de peixes e galinhas os quais contribuirão para tornar a cor dos peixes mais intensa, bem como, a da gema do ovo, garantido uma maior venda destes alimentos para o mercado consumidor (Simpson, 1982).

Vale salientar que, além do seu potencial pigmentante, carapaças de crustáceos dispõem de quitina, a fibra natural mais abundante depois da celulose, a qual é precursora da quitosana. Esta, por sua vez tem sido difundida como um sequestrador de gordura, favorecendo a perda de peso por pessoas submetidas a dietas (Craveiro,1999).

Procurou-se então desenvolver um trabalho que pudesse aproveitar estas carapaças, extraíndo o pigmento existente nas mesmas, aplicando-o em um produto a base do músculo de pescado, observando o efeito pigmentante sobre o mesmo, avaliando sua estabilidade de cor além da influência da embalagem sobre o mesmo durante um período de armazenamento de 60 dias.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo Geral

- Extração dos pigmentos carotenóides dos exoesqueletos de camarão para verificar o seu potencial de uso como aditivo natural de cor em produtos derivados de pescado.

### 2.2 – Objetivos Específicos

- Comparar a eficiência de extração dos pigmentos com solvente orgânicos e óleo vegetal.

- Caracterizar os pigmentos carotenóides extraídos da carapaça de camarão.

- Observar o efeito pigmentante de um extrato de carapaças de camarão em produto elaborado a partir de músculo de pescada.

- Verificar o efeito da embalagem a vácuo sobre a estabilidade da cor nos produtos armazenados em congelamento por 60 dias.

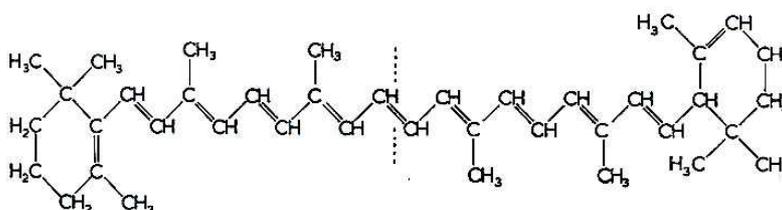
### 3 - REVISÃO DE LITERATURA

A produção mundial de carotenóides naturais é estimada em 100 milhões de toneladas por ano, sendo encabeçada por fucoxantina, o pigmento produzido pelas algas fotossintéticas marrons. Embora os animais não estejam capacitados para a biossíntese de carotenóides, estes podem acumular e ou transformar os precursores que obtêm da dieta, como os  $\beta$ -carotenos, os quais são convertidos em vitamina A (Fontana, 2000). Os carotenóides são responsáveis pela coloração de muitos peixes e crustáceos. Alimentos do mar tais como; o camarão a lagosta e o salmão tem em seus tegumentos ou carne estes pigmentos, promovendo a sua comercialização (Shahidi et al, 1998).

Progresso tem sido obtido nas pesquisas que estudam a estrutura e química dos carotenóides. Já são conhecidos aproximadamente 600 tipos, embora suas funções nas células não sejam completamente esclarecidas (Karnaukhov,1990).

#### 3.1. Estruturas dos carotenóides

Os pigmentos carotenóides possuem propriedades e exercem ações e funções especiais, as quais estão intimamente ligadas às suas estruturas. Segundo Gross (1991), estes pigmentos tem a estrutura básica de um tetraterpeno de 40 carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal modo que a molécula é linear e simétrica, sendo que no centro dela esta simetria é invertida, conforme é vista na figura 1.

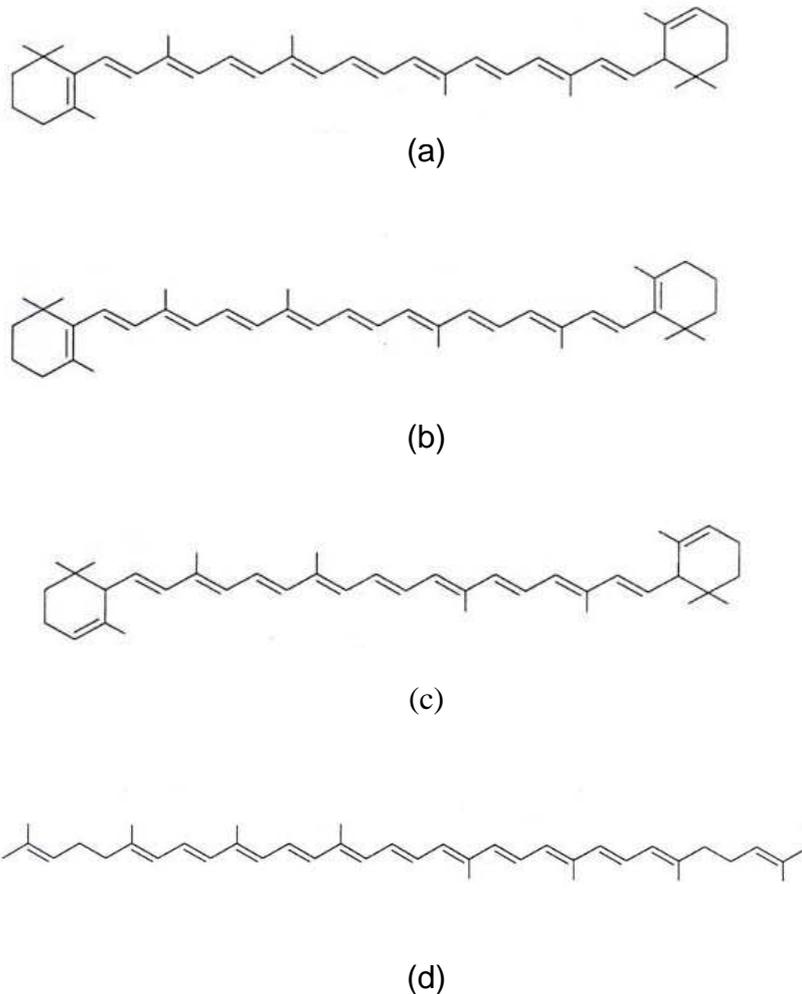


**Figura 1** - Estrutura dos Carotenóides (Gross, 1991)

O sistema de duplas ligações conjugadas constitui um cromóforo, o qual é responsável pela variação de cor, do amarelo ao vermelho, característica dos carotenóides (Booth, 1957).

### 3.2. Classificação de carotenóides

Carotenóides podem ser classificados como carotenos, os quais constituem-se em hidrocarbonetos altamente insaturados ( $C_{40}H_{56}$ ) não contendo oxigênio, apresentando cor laranja, com solubilidade em éter de petróleo. Estes, incluem o  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\epsilon$ - caroteno e o licopeno caracterizados na figura 2.



**Figura 2** - Estruturas químicas de  $\alpha$  - caroteno (a),  $\beta$  - caroteno (b),  $\epsilon$  - caroteno (c), e licopeno (d) (Shahidi et al, 1998).

Uma segunda classe é a das xantofilas, derivadas do caroteno, contendo um ou mais grupos oxigenados nos sítios terminais dos anéis, caracterizados por grupos álcoois, aldeídos, cetonas e epóxidos (Shahidi et al, 1998).

Segundo Haard (1992), os pigmentos de espécies marinhas podem ser divididos em três categorias:

1. Pigmentos semelhantes aos carotenóides e hemoproteínas, os quais são sintetizados ou acumulados no animal.

2. Os pigmentos formados nos tecidos após a morte do animal, como resultado de injúria ou mesmo das condições de processamento. Estes incluem os produtos resultantes das reações de escurecimento enzimático e não enzimático.

3. Aditivos corantes, que podem ser adicionados na alimentação dos peixes ou aplicados em produtos de pescado.

Os carotenóides podem ser ligeiramente solúveis em meio aquoso. Isto é possível devido a ligação do pigmento ao grupamento hidrofóbico de uma proteína. O complexo formado entre os dois é denominado carotenoproteínas, constituindo-se em uma outra classe de pigmentos (Lee,1966). A associação do pigmento carotenóide com a proteína pode resultar em dois efeitos: o pigmento pode tornar-se solúvel em água e mudar sua coloração (Fox & Vevers, 1960).

São encontrados três tipos de carotenoproteínas nos crustáceos: 1.Carotenolipoproteínas, as quais apresentam cor azul, verde ou púrpura e são comumente encontradas em ovários e ovas. 2.Quitinocarotenóides, presentes no exoesqueleto. Os mesmos são formados de quitina e carotenóide, provavelmente pela ligação de uma base de Schiff ou um grupamento carbonila, entre o terminal do grupamento amino da quitina com os ceto-grupos dos carotenóides. O último tipo, 3.são as carotenoproteínas denominadas como verdadeiras, semelhante à crustacianina, na qual o carotenóide, quase sempre a astaxantina, é liberado quando da clivagem do mesmo (Ghidalia,1985).

Em crustáceos submetidos ao cozimento, ocorre uma desnaturação do carotenóide astaxantina da proteína, o qual é oxidado a astaceno, alterando a cor destes para vermelho (Fox & Vevers, 1960).

Carotenos e xantofilas diferem não somente na estrutura química mas também na diversificação e distribuição. Geralmente, carotenos tem sua distribuição associada às plantas enquanto que os organismos carotenogênicos, estão associados aos animais (Shahidi et al, 1998).

Analisando a distribuição destes pigmentos, observa-se a disposição dos mesmos nas seguintes fontes:

**A) Algas.** - Semelhantes às plantas superiores com respeito ao tipo, distribuição e localização dos seus carotenóides. Este grupo inclui as clorofilas (algas verdes), luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina, sendo as três últimas as mais encontradas.

**B) Plantas.** - Os principais carotenóides neste grupo são  $\beta$ -caroteno, luteína, violaxantina e neoxantina. Os intermediários (menos coloridos), são o fitoeno e fitoflueno, também menos abundantes. Outros carotenóides presentes nas plantas superiores são astaxantina, latoxantina, bixina, crocetina, rodoxantina e licoxantina (Goodwin & Britton, 1988).

**C) Animais.** - Em contraste com as plantas, a distribuição qualitativa e quantitativa de carotenóides em fontes animais é o resultado de hábitos dietéticos específicos, absorção, transformações metabólicas e simbiose. A variedade de carotenóides que ocorre em animais é comparável com o que ocorre em pétalas, frutas e sementes.

Invertebrados marinhos e terrestres, semelhantes as esponjas, equinodermos, crustáceos e insetos são particularmente ricos em carotenóides, como também um grande número de peixes e pássaros. Neste contexto os carotenóides mais largamente distribuídos são derivados oxigenados do  $\beta$ -caroteno,

tais como: astaxantina, cantaxantina, equinenona, luteína e zeaxantina (Latscha,1990). Em crustáceos, a astaxantina é talvez o mais importante de todos os carotenóides, enquanto que nos peixes a tunaxantina, a zeaxantina, a luteína bem como a astaxantina são particularmente comuns (Shahidi et al, 1998). Carotenóides são também encontrados em ovas, fígado, esperma e intestino de peixes.

### 3.3. Funções dos carotenóides

Em contraste com o rápido progresso no conhecimento das suas estruturas químicas, o papel biológico dos carotenóides em animais ainda permanece uma incógnita (Karnaukhov, 1990).

#### 3.3.1. Precursor da Vitamina A

Uma das funções fisiológicas mais importantes dos carotenóides é a sua atividade como precursor de vitamina A em animais (Gross, 1991). Quase todos os animais são capazes de converter enzimaticamente os carotenóides de plantas em vitamina A, que é um micronutriente essencial na dieta animal, indispensável para a visão e o crescimento.

O  $\beta$ -caroteno é o principal pigmento responsável por esta função. Contudo, reivindicações colocam a astaxantina como um precursor particular de vitamina A em crustáceos. Na realidade, experimentos indicam que não somente a astaxantina, mas cantaxantina e isozeaxantina convertem-se em vitaminas A e A<sub>2</sub> nestas espécies (Olson, 1999).

#### 3.3.2.Reprodução

De particular interesse é o efeito dos carotenóides no sistema endócrino com respeito ao desenvolvimento gonadal, maturação, fertilização, viabilidade de

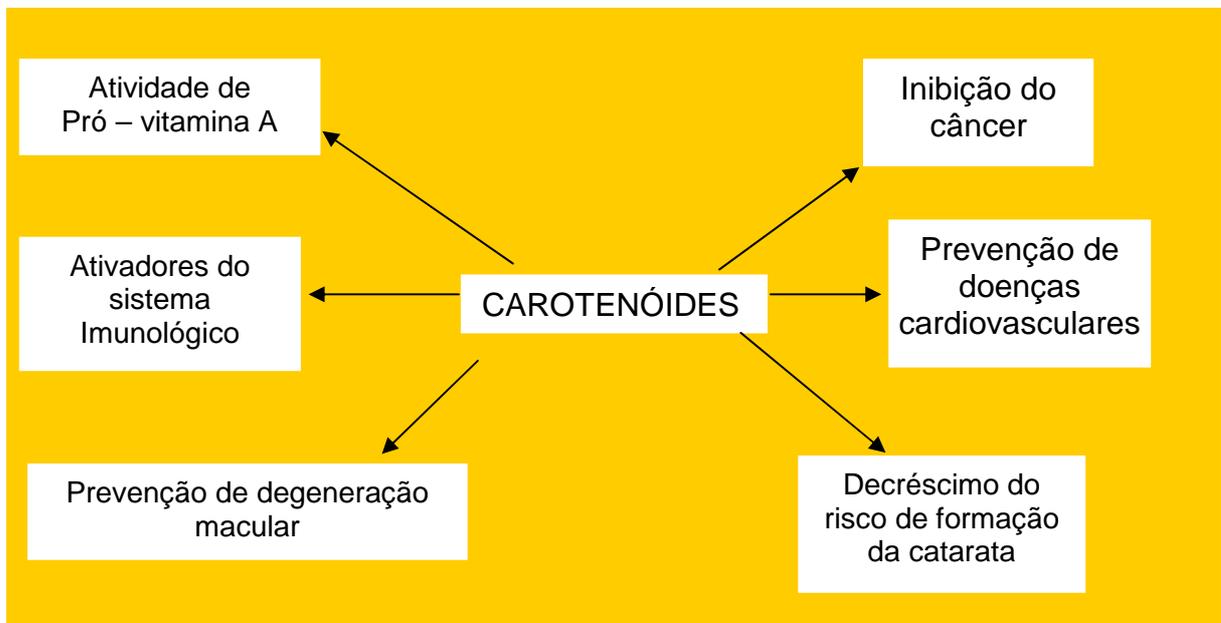
nascimento e crescimento, particularmente em peixes e crustáceos (Meyers, 1977). Astaxantina, por exemplo, tem sido relatada por ter um efeito positivo no crescimento de salmão durante a fase de alimentação de peixes novos (Shahidi et al, 1998).

### 3.3.3. Estabilização de Proteína

Outra importante função dos carotenóides é sua influência na estabilidade de proteínas pela formação do complexo caroteno-proteína (carotenoproteínas). Separando o carotenóide da proteína isso pode levar à uma desestabilização da estrutura terciária da proteína, resultando numa baixa estabilidade da mesma e do próprio carotenóide.

### 3.3.4 Proteção contra doenças

Os pigmentos carotenóides estão associados a diversas funções de proteção contra as doenças, relatadas na figura 3.



**Figura 3** - Atuação dos carotenóides nas doenças (Rodriguez-Amaya, 1997).

Atualmente, tem-se intensificado a atribuição de ações preventivas contra doenças, aos carotenóides. Estas ações, ligadas ao sistema fisiológico, se refletem na proteção de doenças como cânceres de pulmão, próstata, estômago, esôfago, etc. Além disso, são também indicados no tratamento de doenças cardiovasculares e, para evitar a degeneração macular (Olson, 1999).

A ação protetora destes pigmentos está associada à propriedade que estes tem de agir como um antioxidante (Olson, 1999).

### 3.3.5. Seqüestradores de Oxigênio Singlete e Tripleto

Carotenóides são conhecidos pela capacidade de sequestrar oxigênio singlete e tripleto evitando a oxidação celular. Porém, nem todos os carotenóides são igualmente efetivos na proteção fotoquímica. O licopeno, por exemplo é conhecido por sua eficiência no sequestro de oxigênio singlete quando comparado com outros pigmentos carotenóides.

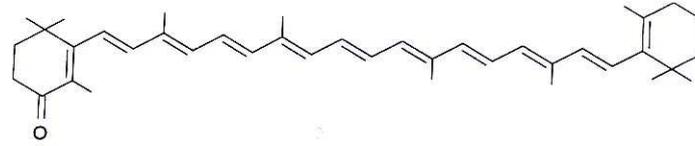
A capacidade dos carotenóides em sequestrar oxigênio singlete e tripleto está associada ao baixo nível energético, para que haja transferência do oxigênio excitado. No estado tripleto os dois elétrons dos orbitais tem o mesmo spin ainda que estejam colocados em orbitais distintos, e estes elétrons se distribuem em cumprimento com o princípio da exclusão de Pauli, sendo portanto baixa a sua energia de repulsão. No estado singlete, entretanto, os dois elétrons tem spins opostos e como consequência, é grande a repulsão eletrostática, dando lugar a um estado excitado. O oxigênio singlete é mais eletrofílico que o tripleto, o que o torna mais reativo (em torno de umas 1500 vezes mais rápido), o que vai proporcionar sua ligação ao C=C dos hidroperóxidos, resultando num rompimento desta ligação, e início de uma reação em cadeia por radicais livres, (Fenema 1993). A capacidade dos pigmentos carotenóides em sequestrar estes tipos de oxigênio está associada ao sistema de duplas ligações conjugadas, sendo demonstrado que carotenóides com nove ou mais destas duplas ligações têm maior poder sequestrante (Rodriguez-Amaya, 1999).

### 3.4. Carotenóides em crustáceos

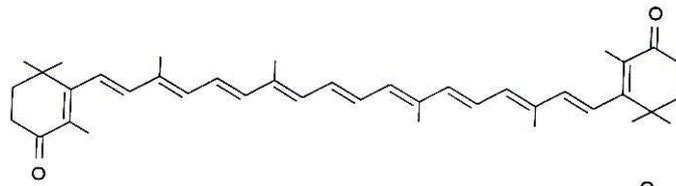
Crustáceos, assim como outros animais são incapazes de sintetizar carotenóides. Contudo, eles absorvem eficientemente estes pigmentos da sua dieta. Fisicoquimicamente, os pigmentos carotenóides podem ocorrer na forma livre ou esterificada. Carotenóides livres ou esterificados podem se acumular na forma de dispersões lipídicas, por exemplo, como componente estrutural, semelhante a quitina na carapaça de crustáceos (Metusalach et al, 1997).

Os carotenóides em crustáceos são estruturas C:40 com grupamentos  $\beta$  e  $\epsilon$  cíclicos. A localização da hidroxila, ceto e/ou substituíntes ceto - hidroxil em um ou ambos os anéis terminais determinam as diferentes formas de carotenóides que são observados nestes animais. De acordo com Ghidalia (1985), os principais tipos de pigmentos nos crustáceos são: carotenos, carotenóides hidrocarbonetos, xantofilas, carotenóides contendo oxigênio, carotenóides conjugados, que são principalmente carotenoproteínas, carotenolipoproteínas e quitinocarotenóides.

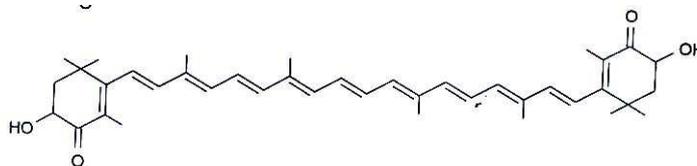
Os carotenóides em crustáceos incluem  $\beta,\beta$ -caroteno, equinenona, cantaxantina, dois estereoisômeros de foenicoxantina e três estereoisômeros de astaxantina (Shahidi et al, 1998).



(a)



(b)



(c)

**Figura 4** - Carotenóides do tipo xantofila presentes em crustáceos: (a) equinenona, (b) cantaxantina, (c) astaxantina (Shahidi et al, 1998).

No camarão *Penaeus japonicus* e na lagosta *Panulirus japonicus* foram encontrados como pigmentos principais a astaxantina e  $\beta$ -caroteno (Katayama et al, 1972).  $\beta$ , $\beta$ -caroteno é incorporado dentro do corpo como astaxantina via isocriptoxantina, equinenona, 4-hidroxiequinenona, cantaxantina e 3-hidroxycantaxantina. Em camarão *Penaeus japonicus*,  $\beta$ -caroteno, equinenona, cantaxantina, 3-hidroxycantaxantina e astaxantina foram encontrados nos órgãos

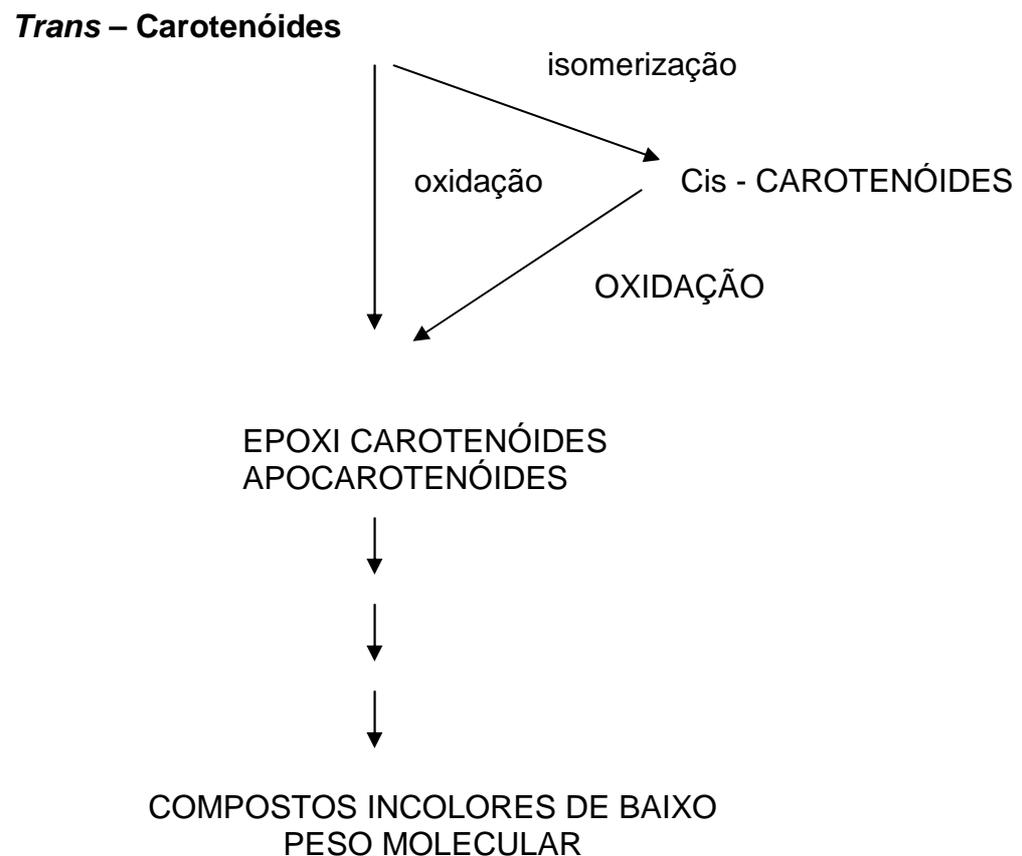
internos, e 3-hidroxicantaxantina e astaxantina foram encontrados na carapaça (Katayama et al, 1972). Na lagosta e caranguejo *Portunus trituberculatus*, somente  $\beta$ -caroteno, isocriptoxantina, equinenona e astaxantina foram encontrados apenas nos órgãos internos, enquanto 4-hidroxi equinenona, cantaxantina, 3-hidroxicantaxantina, e astaxantina estavam também presentes na carapaça (Johnson & Ang, 1991). Similarmente, Shahidi et al (1998), isolaram astaxantina, ésteres de astaxantina e zeaxantina do camarão *Pandalus borealis* e astaceno, cantaxantina e luteína do processamento de descartes de caranguejo da neve *Chionoecetes opilio*.

A carapaça, bem como, o exoesqueleto de crustáceos contém principalmente astaxantina livre e luteína. A astaxantina representa 90% do total de pigmentos presentes na carapaça do camarão *Penaeus japonicus* e 70% do camarão *Pandalus borealis*, (Shahidi & Synowiecki, 1991).

Astaxantina está presente em carapaças de crustáceos como lagostas, caranguejos e camarões. No estado *in natura*, esta xantofila encontra-se combinada com proteína, produzindo cores variando entre marrom, verde, azul e violeta. Por exemplo, astaxantina vermelha quando ligada com proteína, forma uma coloração azul na carapaça de lagostas, o complexo sendo conhecido como  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - crustacianina (Ogawa, 1999).

### 3.5. Degradação de pigmentos carotenóides

Devido os carotenóides possuírem na sua estrutura, duplas ligações conjugadas, eles são bastante susceptíveis à oxidação, o que pode levar a uma epoxidação e conseqüente formação de apocarotenóis, conforme figura 5



**Figura 5** - Possível esquema para a degradação de carotenóides (Rodríguez-Amaya, 1999).

Esta mudança na estrutura molecular ocasiona a transformação da forma estável trans para a forma cis a qual é responsável pelo desencadeamento da oxidação, e está associada também a alterações durante o aquecimento. Estes isômeros (trans e cis) são responsáveis pela reação acima descrita.

Esta isomerização, decorre do contato dos pigmentos com ácidos, calor e exposição à luz, o que faz com que os carotenóides percam sua cor.

Sem dúvida, a principal causa da perda destes pigmentos são as reações de oxidação enzimática e não enzimática, as quais estão associadas à presença de oxigênio na estrutura do carotenóide.

Em contraste com a oxidação que ocorre em lipídios, a oxidação em carotenóides não está bem definida. Possivelmente, esta começa com uma epoxidação, formação de apocarotenóides e hidroxilação. Fragmentações subsequentes, presumivelmente levam ao surgimento de uma série de compostos de baixo peso molecular, que podem ser desejáveis no desenvolvimento de sabor e aroma de chás e vinhos (Rodriguez-Amaya, 1999).

Carotenóides são relativamente estáveis durante a sua estocagem. O congelamento, por sua vez, causa pequena mudança no conteúdo destes pigmentos (Fennema, 1993).

Na decomposição de carotenóides, são apresentados como principais fatores que influenciam esta degradação os seguintes: estrutura do carotenóide, presença de oxigênio no meio, exposição à luz, atividade de água, temperatura, presença de antioxidantes, prooxidantes, início de reação de radicais livres e sulfitos (Rodriguez-Amaya, 1999). Segundo essa autora tais situações dependem da natureza e composição variada dos alimentos, atividade da lipoxigenase e outras enzimas, condições de embalagem e estocagem bem como da oxidação dos lipídios.

A diminuição da cor dos carotenóides causada pela oxidação é um fator importante de deterioração em determinados produtos alimentícios, que contém estes pigmentos. Tal é o caso em óleos essenciais, que em seu estado natural estão geralmente coloridos pelos carotenóides, porém, perdem a cor devido à oxidação e portanto, esta é uma importante causa de descoloração dos pigmentos. Esta reação se processa de dois modos, o químico e o enzimático influenciada por fatores tais como: luz, calor, íons metálicos, compostos hemáticos, ácidos graxos insaturados etc.

### 3.6. Aplicação dos Carotenóides em alimentos

O uso de carotenóides naturais, como potencial aditivo de cor, tem sido amplamente discutido nos últimos anos. Como resultado de pesquisas nesta área,

foram aprovados pela legislação, pigmentos como a cantaxantina para uso em alimentos e bebidas. Os mesmos encontram-se disponíveis no mercado em forma de dispersões, pós e emulsões. (Mandeville et al, 1991). No Brasil, corantes como cantaxantina,  $\beta$ -apo-8-carotenol tem sido disponibilizados no mercado pela resolução 385 de agosto de 1999 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVS) do Ministério da Saúde (MS).

Chen & Meyers (1982), tem extraído carotenoproteínas do peixe, além de crustáceos (camarão, lagosta, caranquejo) utilizando-os como corante na ração de galinhas, dando uma coloração mais intensa à gema do ovo. Outra possibilidade para o aproveitamento destes, é a extração de componentes ativos do flavor, sendo incorporados em sopas e / ou produtos tipo imitação (surimi) (Lorenz, 1998).

A elaboração de produtos tipo imitação a partir do músculo de pescado constitui-se em uma alternativa promissora para a elaboração de produtos alimentícios de alta qualidade nutricional e economicamente viáveis (Madrid, 1999). Para agregar valor ao mesmo, vale a utilização do extrato pigmentado na composição destes, para que seja acentuada a sua cor característica.

$\beta$ -caroteno é utilizado na formulação de margarinas, desenvolvendo uma função antioxidante, tornando-a mais estável (Sambale,1999).

Em formulações de produtos derivados do leite, por exemplo; no iogurte, é indicado o uso de  $\beta$ -caroteno, o qual, permite uma maior estabilidade da riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>) (Sambale,1999).

A pigmentação do músculo ou mesmo a pele dos peixes de fazenda está associada principalmente à inclusão na dieta de astaxantina sintética (Storebakken et al., 1986 ). O uso de pigmentos carotenóides na aquicultura é bem documentado, desenvolvendo múltiplas funções tais como: antioxidante, atividade de pró vitamina A, crescimento, maturação, etc.

Resíduos de crustáceos constituem-se em uma fonte natural de astaxantina para pigmentação de peixes cultivados, através da sua adição na ração de alimentação dos mesmos, principalmente salmões e trutas (Simpson & Chichester,1981).

Xantofilas são discutidas como possíveis precursores de vitamina A<sub>2</sub> (deidroretinol) nos peixes de água doce.

A utilização de pigmentos carotenóides em alimentos é mais vantajosa visto estes serem naturais e ter uma cor altamente desejável na faixa do amarelo ao vermelho. Contudo, apresentam a desvantagem de ter um alto custo quando comparado ao sintético, além de alta sensibilidade à degradação (Lemos, 1984).

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Descrição do experimento

Este trabalho constituiu-se da preparação de um extrato pigmentado obtido de carapaças de camarão e sua posterior aplicação em um produto derivado de pescado, denominado fishbúrger.

O experimento foi dividido em duas etapas: na primeira, foi estudada a extração do pigmento das cascas de camarão e sua caracterização química; na segunda, o extrato pigmentado foi aplicado no fishbúrger, o qual foi embalado com e sem vácuo e submetido à uma estocagem à (-20°C) durante um período de 60 dias. Durante este período a estabilidade da cor dos produtos foi determinada.

### 4.2. Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste experimento foi constituída das cascas da cauda de camarão da espécie *Penaeus subtilis*, Farfan fornecida pela Indústria Inter Frios (Fortaleza-Ce), a qual foi transportada ao Laboratório de Carnes e Pescados do Departamento de Tecnologia de Alimentos (UFC) e imediatamente processada.

Na elaboração do fishbúrger foi utilizada a parte comestível dos peixes vermelhos pargo (*Lutjanus purpureus*), guaiuba (*Ocyurus chrysurus*), e ariacó (*Lutjanus synagris*), adquiridos numa peixaria local, além de ingredientes de formulação tais como: sal, pimenta em pó branca, cebola e extrato oleoso pigmentado em substituição à gordura.

#### 4.3. Extração dos pigmentos das cascas do camarão

Foram testados dois métodos de extração: o primeiro, de acordo com Christophersen et al. (1989), no qual pesou-se 3kg de cascas e levou-se para cozimento em água fervendo por 15 minutos. Após, eram passadas em uma peneira com furos de 4mm e, posteriormente levadas à estufa para secagem por um tempo de 5 horas a 60°C. Em seguida, as cascas eram trituradas em moinho tipo Willye TE 048 (Tecnal, Piracicaba - SP) com placa de furos de 3mm de diâmetro. Foram pesados 30g deste triturado adicionados de 50mL de acetona, homogeneizados em um triturador do tipo Terrotec (Tecnal, Piracicaba - SP) conforme figura 6, por 30 minutos.



**Figura 6** - Homogeneização do Extrato Pigmentado

O homogeneizado resultante foi filtrado com ajuda de vácuo em um frasco de Kitassato através de um funil de Buchner, munido com papel de filtro comum.

Esta operação foi repetida até o filtrado sair incolor, retornando-se cada vez o resíduo ao homogeneizador, antes de se adicionar uma nova porção de acetona.



**Figura 7** - Filtração do extrato pigmentado através de funil de Buchner em frasco de Kitassato

O extrato resultante da filtração foi então transferido para éter de petróleo da seguinte maneira: foram adicionados cerca de 100mL de éter de petróleo em um funil de separação e em seguida, transferiu-se em torno de 15mL do extrato cetônico para o funil, acrescentando-se aproximadamente 50mL de água cuidadosamente pela parede do mesmo, sendo suficiente para ser observada a transferência dos pigmentos para a fase etérea. A fase aquosa inferior foi descartada. Esta operação se repetiu até que houvesse completa remoção da acetona. Finalmente, foi adicionado sulfato de sódio anidro para remoção da água remanescente na camada etérea. O extrato etéreo foi então concentrado até evaporação completa do solvente, num evaporador rotativo modelo TE 210 (Tecnal, Piracicaba – SP) a temperatura de 45°C. O material sólido residual foi suspenso em aproximadamente 100mL de éter de petróleo.

Para o segundo método, de acordo com Chen & Meyers (1982), foi seguido o mesmo procedimento anterior até a etapa de trituração das cascas de camarão. Foram pesados 60 g do triturado, adicionando-se ao mesmo 60mL de óleo de soja comercial Lisa (Refinadora Cargill S/A Uberlândia – MG), aquecendo em banho-maria a 80°C por 30 minutos. A suspensão era retirada do banho, prensada numa prensa mecânica (Camponesa, Fortaleza – Ce), obtendo-se assim o extrato oleoso pigmentado.

Utilizando o extrato pigmentado em éter de petróleo foi dada seqüência à análise dos pigmentos.

#### 4.4. Análise dos pigmentos das cascas do camarão

As análises realizadas nesta fase foram realizadas no Laboratório de Carotenóides do Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.

##### 4.4.1.Saponificação do extrato

Foi retirada uma alíquota de 25mL da solução contendo os pigmentos totais em éter de petróleo, acrescentando-se à mesma aproximadamente 50 mL de solução metanólica de hidróxido de potássio a 10% em metanol, deixando a mistura em repouso por dezesseis horas.

Após a fase de saponificação a mistura foi transferida para um funil de separação de 500mL, sendo em seguida adicionados 100 mL de éter etílico e aproximadamente 150 mL de água, para que ocorresse a separação das fases etérea e metanólica.

A solução saponificada foi lavada com água repetidas vezes, até que a alcalinidade no meio não fosse detectada. Posteriormente, foi adicionado sulfato de sódio anidro para eliminar a umidade presente no meio, e a solução, concentrada a

secura em um rotavapor a 45<sup>0</sup>C. Em seguida os pigmentos foram transferidos com pequenas porções de éter de petróleo para um balão volumétrico de 25 mL (figura 8), levando-se a volume com o mesmo solvente. A solução foi estocada na geladeira a 4<sup>0</sup>C.



**Figura 8** - Extrato pigmentado resultante da filtração e posterior concentração

#### 4.4.2. Análise espectrofotométrica do extrato pigmentado

A análise do extrato pigmentado se deu por varredura espectrofotométrica. Da solução saponificada foi retirada uma alíquota de 1mL e aferida em um balão de 25mL com éter de petróleo. Uma alíquota de 1mL desta diluição foi transferida para o espectrofotômetro (Beckman DU 640) e lida num intervalo de comprimento de onda de 350 a 480nm, utilizando-se um detector de arranjo de diodos acoplado ao espectrofotômetro. Paralelamente, foi preparado um padrão de astaxantina (Sigma, St. Louis, MO) em éter de petróleo e levado à leitura no mesmo intervalo de comprimento de onda citado anteriormente.

#### 4.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para ser desenvolvida a CLAE, foi retirada uma alíquota de 5mL do extrato saponificado, colocada em um tubo de ensaio e seca com nitrogênio. Após a secagem, a amostra foi suspensa em éter etílico (50 mL) e seca novamente, como exposto anteriormente. Foram utilizados 2 mL de acetona para suspensão da amostra no tubo, levando ao freezer por meia hora. Após este tempo, foi retirado 1 $\mu$ L da amostra fria e injetou-se na coluna cromatográfica.

Foi desenvolvida uma análise em HPLC segundo método modificado de Heinonen (1990). Para tal foi utilizada uma coluna C<sub>18</sub> Sphrisorb DOS de dimensões 150 x 4,6 mm e 3  $\mu$ m de diâmetro interno e uma mistura de acetonitrila (60%), metanol (20%) e acetato de etila (20%), como fase móvel, eluindo-se a uma velocidade de 1mL/min e detecção no espectrofotômetro a 480nm.

#### 4.4.4. Cromatografia em camada delgada

O extrato original, o extrato saponificado e um padrão de astaxantina (Sigma, St. Louis, MO) foram aplicados em uma placa de camada delgada da SIGMA-ALDRICH de sílica-gel sobre cromatoplaça de alumínio 20x20cm, com um capilar. A placa foi colocada numa cuba saturada, com fase móvel de solução 3% metanol em benzeno (v/v), e desenvolvida por 45 minutos. Após este tempo, a placa cromatográfica foi colocada dentro de um Becker com aproximadamente 50mL de HCl concentrado e deixada na capela, para serem revelados os pigmentos.

#### 4.5 Uso dos pigmentos no produto alimentar

Para aplicar os pigmentos obtidos do camarão no produto alimentar preparou-se um concentrado oleoso, pesando se aproximadamente 0,4g de pigmentos secos extraídos em éter de petróleo, e diluindo-os com 300 mL de óleo de soja Lisa.

##### 4.5.1. Elaboração do produto.

Os peixes pargo, ariacó e guaiúba foram eviscerados e após esta operação filetados. Obtidos os filés, estes foram triturados em um moinho (Vicris – SP) com uma placa de furos de 8mm.

A massa de pescado obtida na trituração foi então submetida a quatro lavagens em água com gelo e posteriormente filtrada através de uma peneira com furos de 3mm. O excesso de umidade foi retirado mediante prensagem até se obter uma massa com umidade semelhante à dos filés antes da trituração.

A massa de pescado obtida na trituração foi então submetida a quatro lavagens em água com gelo e posteriormente filtrada através de uma peneira com furos de 3mm. O excesso de umidade foi retirado mediante prensagem até se obter uma massa com umidade semelhante à dos filés antes da trituração.

Após estas etapas foi formulado o fishbúnger conforme estabelecido na tabela 1.

**Tabela 1** - Formulação de fishbúrgers

INGREDIENTES	%
Massa de pescado	82
Amido	5,0
Açúcar	4,0
Sal	1,5
Cebola	4,0
Pimenta do reino (branca)	0,2
Glutamato monossódico	0,5
Polifosfato	0,3
Extrato oleoso pigmentado	2,5

Os fishbúrgers foram então modelados em placas de petri com 15 cm de diâmetro e 1 cm de profundidade e mantidos nestes recipientes aproximadamente 12 horas. Decorrido este período os fishbúrgers foram retirados das placas para serem embalados. Nesta fase 5 fishbúrgers foram retirados para análise de composição centesimal, 75 fishbúrgers foram embalados em sacos de nylon polietileno e submetidos ao vácuo de 76mm Hg e 75 fishbúrgers embalados em sacos de polietileno e selados sem vácuo. Após embalados, foram então armazenados sob temperatura de congelamento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) por um período de 60 dias, sendo retirados 30 fishbúrgers (15 de cada tratamento) a cada 15 dias, para medição de cor. A primeira medição de cor nos produtos foi realizada com 24 horas de armazenamento, sendo considerando este momento como o dia 0 de armazenamento.

#### 4.5.2. Composição Centesimal dos fishbúrgers

4.5.2.1. Umidade - Em estufa a  $102^{\circ}\text{C}$ , marca Fanem – modelo 315 SE, seguindo a metodologia da A O A C (1990).

4.5.2.2. Gordura - A partir de amostra do fishburger previamente dessecadas até peso constante, com a utilização de um Extrator de Soxhlet, marca Tecnal – modelo TE 044-8/50, de acordo com os procedimentos da A.O.A.C.(1990).

4.5.2.3. Proteína - De acordo com as normas analíticas da A O A C (1990), empregando-se um digestor e destilador Tecnal (modelo TE-036/1), tomando-se como fator de conversão do nitrogênio total o valor de 6,25.

4.5.2.4. Cinza - A incineração da amostra ocorreu em forno mufla, marca Quimis, a uma temperatura média de 550°C, seguindo metodologia preconizada pela A O A C.(1990)

4.5.2.5. Carboidratos - Calculado pela diferença entre 100 e a soma dos percentuais de umidade, gordura, proteína e cinza.

#### 4.5.3. Medição de cor

As medidas foram realizadas em colorímetro Minolta CR 300 (Osaka-Japão), operando no sistema CIE ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), sendo  $L^*$  a luminosidade,  $a^*$ , a intensidade da cor vermelha e  $b^*$  a intensidade da cor amarela. O colorímetro foi calibrado com placa de cerâmica branca e o iluminante utilizado foi o  $D_{65}$ , conforme especificações do fabricante (Minolta, 1998). Foram feitas três medidas em três diferentes pontos na superfície do fishburger, anotando-se os valores médios de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ .

#### 4.6. Análise estatística

Para o estudo da estabilidade da cor dos fishbúrgeres foi utilizado um planejamento experimental completamente casualizado balanceado com dois

fatores: tratamento (embalagem com e sem vácuo) e tempo de armazenamento (0, 15, 30, 45, e 60 dias). Foram calculadas também algumas estatísticas descritivas (Bussab & Morettin, 1987) para observação do comportamento das variáveis. A comparação dos tratamentos ao longo do tempo foi feita usando-se a técnica de Análise de Variância (Montgomery, 1991).

O modelo seguido para a análise de variância foi:

$$Y_{ijk} = \mu \pm \alpha_i \pm \beta_j \pm (\alpha\beta)_{ij} \pm \xi_{ijk}$$

$$i = 1, 2; j = 1, 2, 3, 4, 5; k = 1, 2, \dots, 15$$

onde:

$Y_{ijk}$  : variável resposta (luminosidade  $L^*$  e intensidade de cor  $b^*$ )

$\mu$  : média geral

$\alpha_i$  : efeito do  $i$ -ésimo tratamento

$\beta_j$  : efeito do  $j$ -ésimo tempo

$(\alpha\beta)_{ij}$  : efeito combinado do  $i$ -ésimo tratamento com o  $j$ -ésimo tempo

$$\xi_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$$

Utilizados os pacotes computacionais: SPSS (Statistic Package Social Science), Excel for Windows, CMNTIA e Word for Windows.

## 5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extração

O método de extração de pigmentos com óleo não foi considerado eficiente, haja vista que após a etapa de prensagem que separou o óleo pigmentado da torta de prensa, constituída pelas cascas de camarão trituradas, esta apresentou uma coloração ainda intensa, indicando assim, que muitos pigmentos permaneciam nas cascas depois da prensagem. Diferentemente, a extração dos pigmentos com acetona apresentou maior eficiência, o que foi confirmado através do aspecto do resíduo final, o qual apresentou-se totalmente descolorido.

Por apresentar maior eficiência, o método escolhido para a extração dos pigmentos das carapaças de camarão foi o que utilizava acetona.

### 5.2. Espectrofotometria dos pigmentos das cascas de camarão

Na figura 9 é apresentado o espectro de absorção dos pigmentos carotenóides em éter de petróleo. Nela podem ser observadas a presença de dois picos.

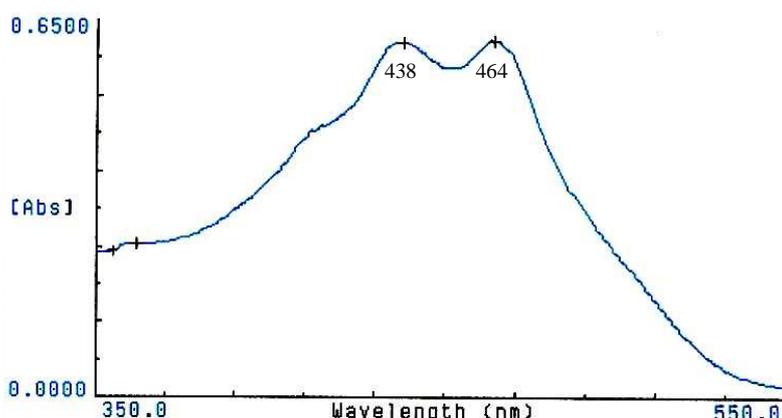


Figura 9. Curva de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides totais extraídos das carapaças de camarão em éter de petróleo.

Foi registrado um pico a 438nm, provavelmente  $\beta$ -apo-10'-carotenal e outro a 464nm, possivelmente cantaxantina. Nenhum deles correspondeu ao obtido para o padrão de astaxantina, que foi de 475nm (Figura 10). Isto, possivelmente indica que a amostra dos pigmentos totais apresentou-se como uma mistura resultante da degradação da astaxantina.

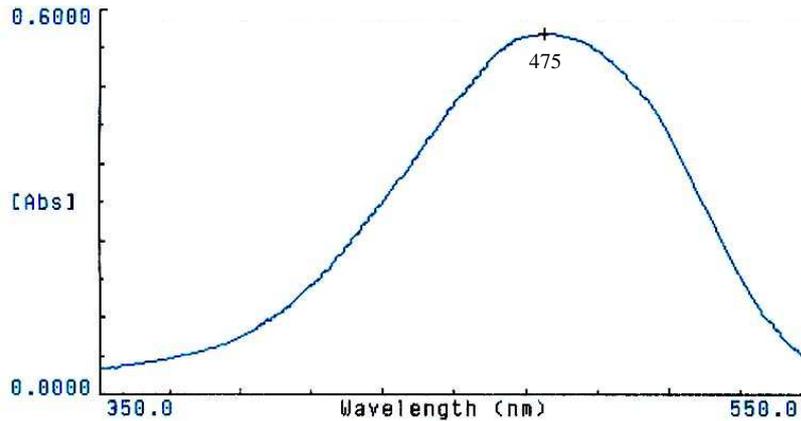


Figura 10. Curva de absorção espectrofotométrica do padrão de astaxantina em éter de petróleo.

Segundo Davies (1976),  $\beta$ -apo-10-carotenal apresenta uma média de absorção de 438nm em éter de petróleo, o que corresponderia ao valor registrado para o primeiro pico dos pigmentos totais encontrado neste trabalho (Figura 9).

O segundo pico registrado a 464nm se aproxima do valor 466nm proposto por Davies (1976) para a cantaxantina.

Chen & Meyers (1982), relatam que enzimas proteolíticas ou lipolíticas, podem promover a degradação de pigmentos, através da autólise e liberação de carotenóides das carotenoproteínas, as quais, estão associadas com componentes lipídicos que, leva à uma liberação de astaxantina livre e seus produtos de degradação, fazendo com que esta seja menos estável do que na forma conjugada, tornando-a mais susceptível à oxidação.

Neste estudo, acredita-se que a degradação da astaxantina tenha ocorrido principalmente devido ao aquecimento por fervura dado às cascas antes da sua trituração, quando o aparecimento da cor vermelha foi mais evidente. Contudo, mesmo em um processo de degradação, os compostos pigmentantes extraídos se apresentaram com intensa coloração vermelha.

### 5.3.Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência dos pigmentos contidos no extrato saponificado não apresentou cromatograma específico, não sendo assim, possível a comparação com resultados obtidos na literatura.

### 5.4.Cromatografia em camada delgada

A tabela 2 apresenta os resultados de Rf, obtidos na cromatografia em camada delgada, para a amostra de pigmentos carotenóides no seu estado de origem (extrato etéreo), extrato saponificado e o padrão de astaxantina em éter de petróleo.

**Tabela 2** - Rfs obtidos da cromatografia em camada delgada de extratos pigmentados de cascas de camarão.

<b>Manchas pigmentadas detectadas.</b>	<b>Rf (Eluição com metanol 3% em benzeno)</b>	
<u>Extrato etéreo</u>		
Mancha I	1,00	Amarelo forte
Mancha II	0,95	Amarelo claro
Mancha III	0,85	Vermelho fraco
<u>Extrato saponificado</u>		
Mancha I	0,50	Rosada
Mancha II	0,52	Amarelo fraco
Mancha III	0,77	Laranja claro
<u>Padrão de Astaxantina</u>		
Mancha	0,75	Laranja intenso

No extrato inicial observou-se a presença de três manchas, a primeira com um Rf de valor 1,0, coincidente com a linha final da corrida e caracterizado por uma cor amarela forte. A segunda mancha correspondeu ao Rf de 0,95 com coloração amarela clara, também não identificado, enquanto que a última apresentou um Rf de 0,85, relatado na literatura como um  $\beta$ -caroteno 5,6,5',6' diepóxido.

Para o extrato saponificado foi detectada a presença de três manchas na cromatografia em camada delgada. A primeira, com uma coloração rosada e Rf de 0,50 foi identificada através da tabela proposta por Davies (1976), como uma cantaxantina enquanto a segunda correspondendo a um valor de Rf de 0,52 se assemelhou ao proposto por Davies (1976) para  $\beta$ -apo-10'-carotenal, o qual tem um Rf de 0,53. O último deste grupo mostrou um valor de 0,77 e cor laranja claro, que foi relatado na literatura como uma  $\beta$ -criptoxantina, a qual apresentou um valor próximo ao do padrão de astaxantina.

Finalmente, o padrão de astaxantina em éter de petróleo apresentou Rf de 0,75 e cor laranja intenso, tendendo pro vermelho.

#### 5.5. Composição centesimal do produto de pescado

Os valores médios e desvio padrão obtidos da análise de composição centesimal (%) do produto elaborado, estão indicados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores da análise de composição centesimal de fishbúrguer de pescado contendo pigmentos de cascas de camarão.

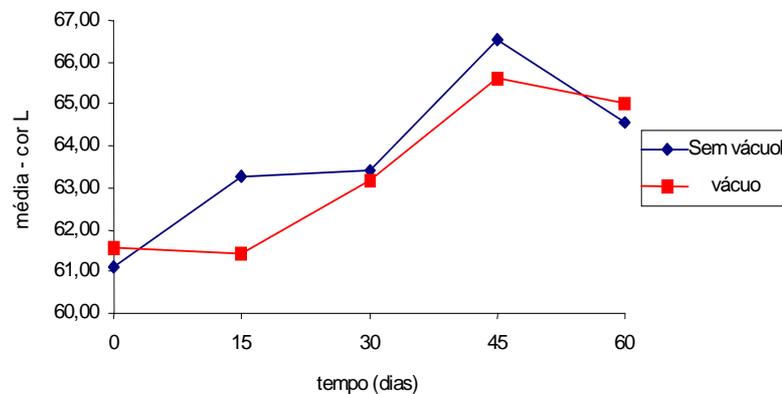
<b>Produto</b>	<b>Umidade</b>	<b>Gordura</b>	<b>Proteína</b>	<b>Cinza</b>	<b>Carboidratos</b>
Fishbúrger	75,47 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,01	12,60 $\pm$ 0,01	1,54 $\pm$ 0,05	9,97 $\pm$ 0,12

Confrontando os percentuais aqui obtidos com os reportados na literatura, para hambúrgueres de pescado (Simões et al, 1998), se verifica que em geral, são

semelhantes para carboidratos e proteína, e pouco mais elevados para a gordura e cinza, e inferiores para a umidade. A presença de carboidratos no produto formulado é consequência da presença de amido. Simões et al. (1998), estudando produtos similares a estes, formulados com base protéica de pescado, encontraram valores semelhantes aos reportados neste trabalho, para proteína (13,90%) e carboidratos (9,60%), e valores pouco mais elevados para gordura (4,70%) e mais baixo para a umidade (69,50%) e cinzas (2,3%).

### 5.6. Medida de cor

Durante a estocagem os tratamentos com e sem vácuo apresentaram valores de  $L^*$  que sugerem um aumento da luminosidade da cor até o 45º dia de armazenamento e um decréscimo daí até o dia 60, indicando assim uma tendência de maior clareamento no produto (figura 11).



**Figura 11** - Perfil médio dos tratamentos ao longo do tempo para a variável de luminosidade ( $L^*$ ) nos fishbúrgers.

A análise de variância, mostrou que ao nível de significância de 5%, houve interação entre tratamento e tempo de armazenamento.

Comparando-se os tratamentos sem vácuo e com vácuo em cada um dos tempos foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os mesmos nos tempos de 15 e 45 dias

Na tabela 4 estão apresentadas as estimativas das médias e respectivos intervalos de confiança de 95% para os tratamentos em cada tempo.

**Tabela 4** - Média, erro padrão e intervalo de confiança dos valores de luminosidade ( $L^*$ ) de fishbúrgers armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 dias.

Tempo *	Tratamento	Média	Erro-padrão	Intervalo de confiança de 95%	
				LI	LS
0	Sem vácuo	61,34	0,15	61,05	61,63
	Vácuo				
15	Sem vácuo	63,29	0,21	62,89	63,70
	Vácuo	61,42	0,21	61,01	61,82
30	Sem vácuo	63,29	0,15	63,01	63,58
	Vácuo				
45	Sem vácuo	66,54	0,21	66,14	66,95
	Vácuo	65,61	0,21	65,20	66,01
60	Sem vácuo	64,78	0,15	64,50	65,07
	Vácuo				

Legenda :

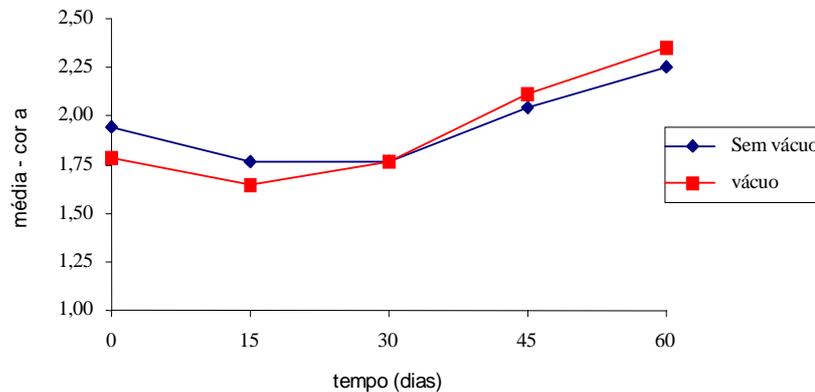
LI - Limite inferior

LS - Limite superior

\* Nos tempos 15 e 45 dias de armazenamento o valor  $L^*$  do tratamento com vácuo e sem vácuo foram diferentes ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados expressos na tabela 3, para um período de 60 dias de armazenamento, os tratamentos com e sem vácuo, indistintamente podem ser utilizados para o acondicionamento dos fishbúrgueres. Entretanto, o tratamento com vácuo apresentou valores de  $L^*$  significativamente menores com 15 e com 45 dias de armazenamento.

Os valores obtidos para a variável de intensidade de cor vermelha  $a^*$  mostram uma tendência de comportamento similar dos dois tratamentos no decorrer do tempo conforme se visualiza na figura 12.



**Figura 12** - Perfil médio dos tratamentos ao longo do tempo para a variável de intensidade da cor vermelha ( $a^*$ ) nos fishbúrgers.

Os baixos valores médios encontrados para a intensidade de cor  $a^*$  indicaram pouca expressão desta cor no fishbúrger.

O teste de análise de variância aplicado não detectou ao nível de significância de 5% a existência de diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos tempos.

Na Tabela 5 estão expressas as estimativas das médias e respectivos intervalos de confiança de 95%.

**Tabela 5** - Média, erro padrão e intervalo de confiança dos valores da intensidade de cor vermelha ( $a^*$ ) de fishbúrgers armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 dias.

Tempo	Média	Erro-padrão	Intervalo de confiança de 95%	
			LI	LS
0	1,87	0,04	1,79	1,94
15	1,71	0,04	1,63	1,79
30	1,76	0,04	1,68	1,84
45	2,08	0,04	2,00	2,16
60	2,30	0,04	2,22	2,38

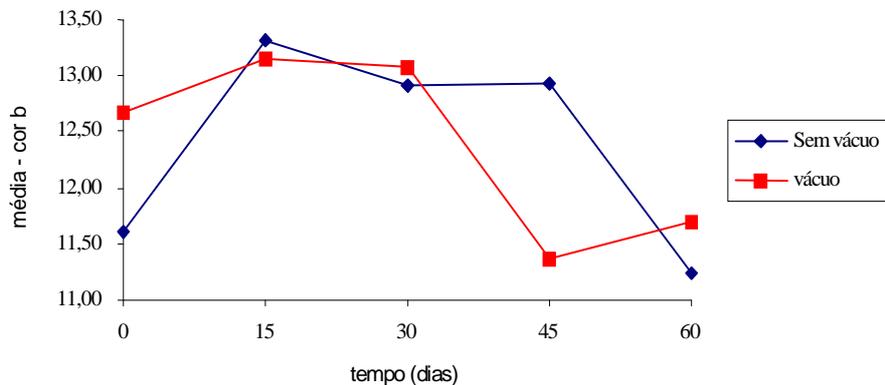
Legenda :

LI - Limite inferior

LS - Limite superior

Até o período de 60 dias de estocagem os tratamentos à vácuo e sem vácuo, influenciam de forma semelhante na cor dos fishbúrgueres.

Para a variável de intensidade de cor amarela  $b^*$ , durante a estocagem, os tratamentos com vácuo e sem vácuo apresentaram valores que indicam um aumento em relação ao período 0, até os 30 dias (tratamento com vácuo) e até os 45 dias (tratamento sem vácuo) (figura 13).



**Figura 13** - Perfil médio dos tratamentos durante a estocagem para a variável  $b^*$ .

Observou-se que a variável de intensidade da cor amarela  $b^*$  apresentou valores mais elevados (entre 11 e 13,5) que a variável de intensidade de cor vermelha  $a^*$  (entre 1,6 e 2,3). Contudo, a cor predominante nos fishbúrgers aproximou-se da cor laranja. Possivelmente, esta diferença pode ser atribuída à concentração dos pigmentos vermelhos do camarão no produto.

A análise de variância, mostrou que, ao nível de significância de 5%, houve interação entre o tratamento e o tempo de armazenamento.

Comparando-se os tratamentos sem vácuo e com vácuo em cada um dos tempos foi observado diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os mesmos com 0 dia e 45 dias de armazenamento (Tabela 6).

**Tabela 6** - Média, erro padrão e intervalo de confiança dos valores de intensidade de cor  $b^*$  de fishbúrgers armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 60 dias.

Tempo	Tratamento	Média	Erro-padrão	Intervalo de Confiança de 95%	
				LI	LS
0	Sem vácuo	11,61	0,17	11,28	11,94
	Vácuo	12,68	0,17	12,35	13,00
15	Sem vácuo	13,23	0,12	12,99	13,46
	Vácuo	13,23	0,12	12,99	13,46
30	Sem vácuo	12,99	0,12	12,76	13,23
	Vácuo	12,99	0,12	12,76	13,23
45	Sem vácuo	12,93	0,17	12,60	13,26
	Vácuo	11,36	0,17	11,03	11,69
60	Sem vácuo	11,47	0,12	11,24	11,71
	Vácuo	11,47	0,12	11,24	11,71

Legenda :

LI - Limite inferior

LS - Limite superior

\*Nos tempos de 0 e 45 dias de armazenamento o valor de  $b^*$  do tratamento com vácuo e sem vácuo foram diferentes ( $p < 0,05$ ).

O componente de intensidade de cor amarela teve valores elevados até os 30 dias de armazenamento dos produtos. Já com 45 dias esses valores decrescem

e no tratamento com vácuo foram significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que no tratamento sem vácuo. Dos resultados obtidos da análise de variância para o tempo de zero a 60 dias de estocagem, verificou-se que os tratamentos à vácuo e sem vácuo se adequam indistintamente para armazenamento do produto influenciando na coloração do produto de modo semelhante.

As diferenças nos valores dos componentes de luminosidade  $L^*$ , de intensidade de cor vermelha  $a^*$  e intensidade de cor amarela  $b^*$  possivelmente podem ser atribuídas a alterações enzimáticas que possam ter ocorrido durante o armazenamento.

De acordo com Hong e Storebakken (1991), o tipo de amostra, reações enzimáticas e a própria utilização do instrumento durante a medida de cor influenciam nos valores obtidos.

Os componentes de intensidade de cor, medidas no sistema CIE  $L^*$ ,  $a^*$   $b^*$  variaram dentro de um intervalo de 59,03 – 63,68 para o parâmetro  $L^*$ , de 1,94 – 2,35 para  $a^*$  e 12,57 – 13,10 para a intensidade de cor  $b^*$ , correspondendo ao descrito por Storebakken et al (1986), anteriormente, em que os mesmos observaram valores semelhantes durante o armazenamento. Isto resultou em dizer que o produto no estudo aqui desenvolvido adquiriu uma cor variando do amarelo ao vermelho, acentuando-se num tom laranja.

Hong e Storebakken (1991), trabalhando com filés de truta congelada, observaram diferenças significativas nas variáveis de intensidade de cor ( $a^*$ ) e ( $b^*$ ), aos três meses de estocagem à vácuo a  $-20^\circ\text{C}$ , em que os mesmos observaram aumento dos valores dessas variáveis durante o armazenamento, o que corresponde ao encontrado para a variável  $b^*$  neste trabalho.

Variações na intensidade da cor vermelha e amarela têm sido observadas em pescados ou seus produtos quando na estocagem em congelamento ( $-20^\circ\text{C}$ ). De acordo com Metusalach et al (1997), este efeito pode ser atribuído à uma variação no conteúdo de carotenóides e sua reflectância, ao ser medida no colorímetro.

## 6. CONCLUSÕES

A extração com acetona é mais eficiente na extração dos pigmentos carotenóides das cascas de camarão do que a extração com o óleo de soja.

Os pigmentos extraídos correspondem a produtos de degradação da astaxantina, os quais apresentam intensa coloração vermelha.

O efeito pigmentante em fishbúrguer depende da concentração do extrato oleoso aplicado.

Existe viabilidade da utilização destes pigmentos como um aditivo de cor em alimentos a base de pescado.

A embalagem à vácuo é mais eficiente para a estabilidade da cor do produto elaborado durante o período de armazenamento.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A O A.C. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Washington, 1990, 1018p.

ARMENTA, E. Extraction of caroprotein from fermented prawn wastes. México: Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. Disponível em < <http://www.confex.com/itt/accepted/405> >. Acesso em: 05 ago.1998.

BOOTH, V.H. Carotene Its determination in biological materials. Cambridge: W. Heffer & Sons,1957. 119 p.

BUSSAB, W.; MORETTIN, P. Estatística básica. Atual (Ed.),1987.

CHEN, H.M. MEYERS, S P. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. Journal Food Science, Louisiana, v.47, n.3 p.892-900, 1982.

CHRISTOPHERSEN, A. G. KNUTHSEN,P. SKIBSTED,L.H. Determination of carotenoids in salmonoids. Z Leensm Unters Forsch, v.188, p.413-418, 1989.

CRAVEIRO, A. A. et al "Quitosana: a fibra do futuro" .Fortaleza: PADETEC/UFC, 1999.122p.

DAVIES,B.H.; Carotenoids In: chemistry and biochemistry of plant pigments: GOODWIN, T.W. (Ed), London: Academic Press. v.2, p 38-165, 1976.

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1993. 1094p.

FONTANA,J.D. Carotenóides (Cores atraentes e ação biológica). Bio Tecnologia: Ciência & Desenvolvimento, Brasília, ano 2, n.13. mar. / abril. 2000.

FOX, H.M., VEVERS,G. The nature of animal colors. London: Sidgwick and Jackson ,1960. 62p.

GOODWIN, T.W.; BRITTON, G. Distribution and analysis of carotenoids in plants pigments. London: Academic press, 1988. 61p.

GHIDALIA, W. Structural and biological aspects of pigments in the biology of crustacea. New York: Academic Press, v.9, 1985.

GROSS, J. Pigments in vegetables: Chlorophylls and carotenoids New York: Van Nostrand Reinhold,. 1991.

HAARD, N. F.; Biochemistry and chemistry of color and color changes in seafood in Advances in Seafood Biochemistry: Compositions and Quality, Flick, G. J. and Martin, R. E.; Eds. Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster and Basel, p.305, 1992.

HEINONEN, M.I. Carotenoids and provitamin A activity of carrot (*Daucus carota L*) cultivars. J. Agric. Food Chem. v.38, p.609-612, 1990.

HONG,K.; STOREBAKKEN,T. Color Stability of Rainbow Trout Fillets during Frozen Storage. Journal of Food Science, v.56, n.4, 1991.

JOHNSON, E. A.; AN, G.H. Astaxanthin from microbial sources. Critical Reviews in Biotechnology, v.11,n.4, p. 297-326, 1991.

KARNAUKHOV, V. N. Carotenoids: recent progress, problems and prospects, Comp. Biochem. Physiol., v.95B, p.1-20,1990.

KATAYAMA, T; KAMATA, T. CHICHESTER, C. The biosynthesis of astaxanthin. VI. The carotenoids in the *Prawn, Penaeus japonicus*, Int. J. Biochem., v.3, p.363-368, 1972.

LAMBERTSEN,G. Method of Analysis of Astaxanthin and Its Occurrence in some Marine Products. J. Sci. Agric. Norway,1971.

LATSCHA, T. Carotenoids: Their nature and significance in animal feeds. Department of animal nutrition and health. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel. Switzerland, 1990.

LEE, W.L. Pigmentation of the marine isopod *Idothea montereyensis*. Comp. Biochem. Physiol., v.18, p.17-36, 1966.

LEMOS, L. C.P. Estudo dos pigmentos carotenóides que ocorrem na pele do pargo (*Lutjanus purpureus poey*) Dissertação ( Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1984.

LORENZ, T. A Review of the Carotenoid, Astaxanthin, as a pigment source and vitamin for cultured *Penaeus Prawn*. Disponível em : < [http:// www. Aquasearch.com/asta.htm](http://www.Aquasearch.com/asta.htm)>. Acesso em: 04 ago. 1998.

MADRID, A.; VICENTE, J.M.; MADRID, R. El pescado y sus productos derivados. 2. ed. Madrid, España: Mundi-Prensa, 1999. 411p.

MANDEVILLE, S. et al. Isolation and identification of carotenoid pigments, lipids and flavor active components from raw commercial shrimp waste. Food Biotechnology, Quebec, v.5, p.185-195, 1991.

METUSALACH, J.; BROWN, A.; SHAHIDI, F. Effects of stocking density on colour characteristics and deposition of carotenoids in cultured Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Food Chemistry, v.59, n 1, p. 107-114, 1997.

MEYERS, S.P. Using crustacean meals and carotenoid fortified diets, *Feedstuffs*, v.43, p.26-28, 1977.

MINOLTA. Precise Color Commucation : color control from perception to instrumentation. Osaka, 1998. 59p.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments, 3rd.ed., 1991.

OGAWA, M.; MAIA, E.L. Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado. São Paulo. Varela, v.1 1999.

OLSON, J.A.; Carotenoids In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. Modern nutrition in health and disease, 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: William & Wilkins, 1999.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin a carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Washington, OMNI, 1997. 88p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A Guide to carotenoid analysis in foods. OMNI. Washington. OMNI, 1999.

SAMBALE, C. Processing characteristics and stability of chemically synthesized carotenoids in food systems. Arch. Latinoamer. Nutr., v.49, n.1, S 48<sub>S</sub> – 51<sub>S</sub>, 1999.

SHAHIDI, F.; SYNOWIECKI, J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. J. Agric. Chem., v.39, p.1527-1532, 1991.

SHAHIDI, F.; METUSALACH.; BROW, A. Carotenoids pigments in seafoods and aquaculture. Critical reviews in food science, v.38, n.1, p.1-67. 1998.

SIMPSON, K. L. Carotenoids pigments in seafood, in chemistry and biochemistry of marine food products. Westport, Connecticut: AVI, 1982. 115p.

SIMÕES, D.R.S. et al. Hambúrgueres formulados com base protéica de pescado. Ciênc. Tecnol. Aliment., Rio Grande, v.18, n.4, p.414-420, 1998.

SIMPSON, K.L.; CHICHESTER, C.O. Metabolism and nutritional significance de carotenoids. Ann. Rev. Nutr.; v.1 p. 351-374, 1981.

STOREBAKKEN,T. et al. Carotenoids in diets for salmonids. Utilization of canthaxanthin from dry and wet diets by atlantic salmon, raibow trout and sea trout. Aquaculture, v.51, p. 245-255, 1986.

## ANEXOS

### Análise Descritiva

Tabela A1 : Estatísticas descritivas da variável de luminosidade L\*

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
Sem vácuo	0	15	59,03	63,11	61,11	1,23	2,01
	15	15	62,69	63,76	63,29	0,34	0,54
	30	15	62,11	64,15	63,42	0,49	0,77
	45	15	65,83	67,27	66,54	0,37	0,55
	60	15	62,92	66,91	64,54	0,99	1,53
Vácuo	0	15	60,02	63,22	61,56	0,95	1,54
	15	15	60,22	62,56	61,42	0,73	1,19
	30	15	61,60	64,34	63,17	0,67	1,05
	45	15	63,55	67,08	65,61	1,02	1,55
	60	15	63,68	66,01	65,03	0,72	1,11

Tabela A2 : Estatísticas descritivas da variável de intensidade de cor a\*

<b>Tratamento</b>	<b>Tempo</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Coefficiente de variação (%)</b>
Sem vácuo	0	15	1,64	2,45	1,94	0,23	11,80
	15	15	1,57	2,26	1,77	0,18	9,92
	30	15	1,43	1,93	1,76	0,12	6,68
	45	15	1,64	2,54	2,04	0,28	13,52
	60	15	1,76	2,71	2,25	0,26	11,39
Vácuo	0	15	1,55	2,23	1,79	0,21	11,70
	15	15	1,45	1,99	1,65	0,16	9,49
	30	15	1,37	2,32	1,76	0,22	12,66
	45	15	1,63	2,61	2,11	0,29	13,54
	60	15	2,03	2,69	2,35	0,18	7,74

Tabela.A3 : Estatísticas descritivas da variável de intensidade de cor b\*

Tratamento	Tempo	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio-padrão	Coefficiente de Variação
tradicional	0	15	10,42	12,57	11,61	0,63	5,47
	15	15	12,02	14,33	13,31	0,60	4,52
	30	15	11,62	13,63	12,91	0,60	4,62
	45	15	11,78	14,17	12,93	0,64	4,93
	60	15	10,40	12,13	11,24	0,55	4,86
Vácuo	0	15	11,77	13,70	12,68	0,62	4,85
	15	15	11,98	14,42	13,15	0,63	4,80
	30	15	11,91	13,79	13,07	0,58	4,41
	45	15	10,48	13,03	11,36	0,83	7,31
	60	15	10,42	13,10	11,70	0,78	6,70

As figuras A1, A2 e.A3. apresentam os gráficos do tipo box-plot. para visualização da análise descritiva.

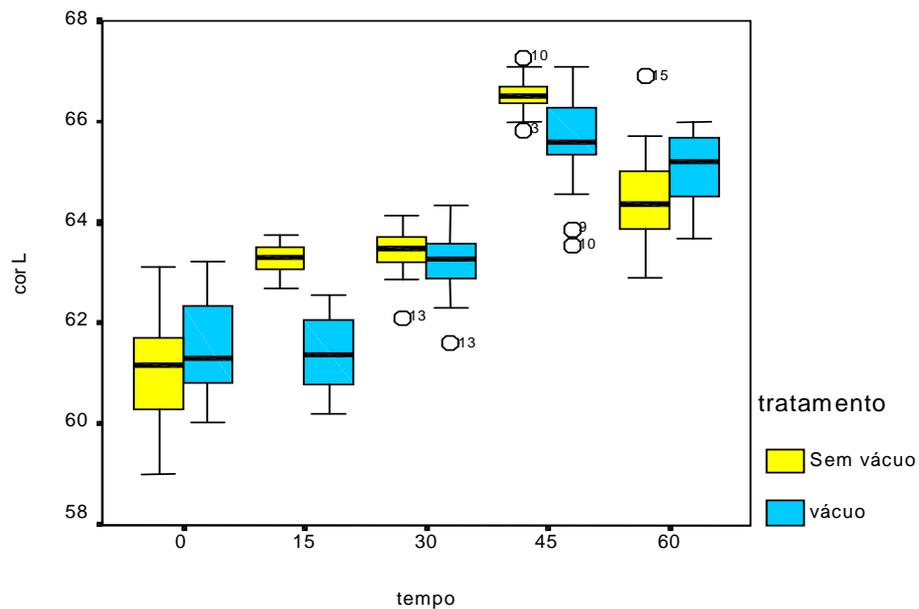


Figura A1 – Box-plot da variável de iluminosidade L\*

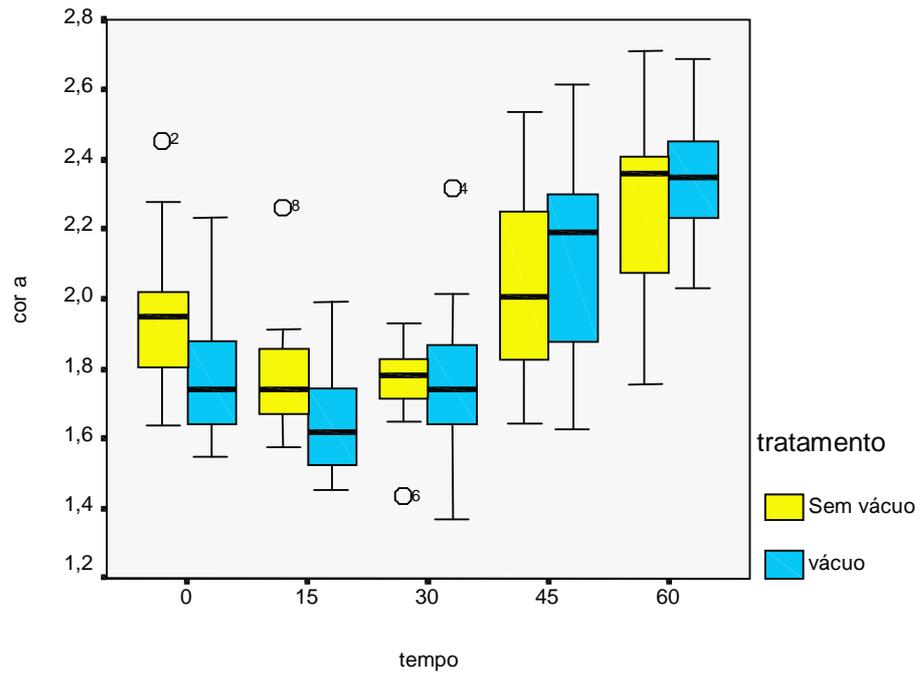


Figura A2 – box-plot da variável de intensidade de cor a

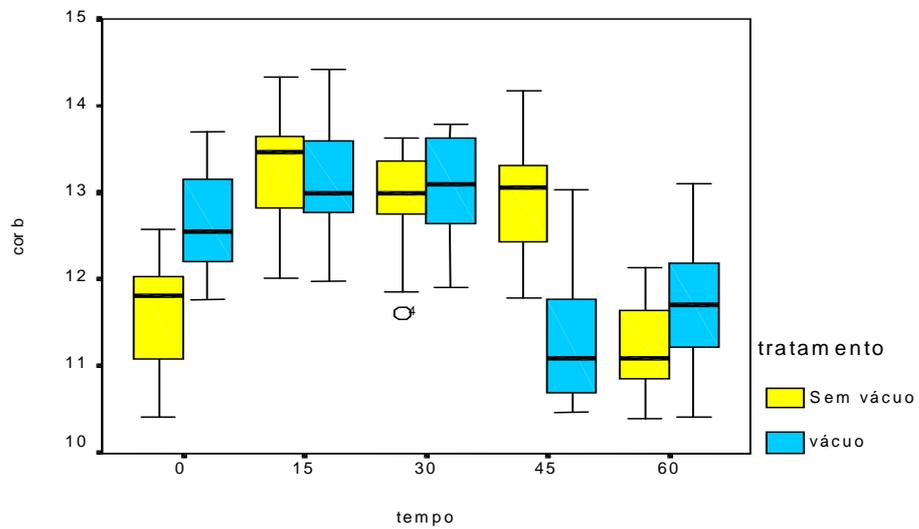


Figura A3 – Box-plot da variável de intensidade de cor b.

### Análise de Variância

Tabela A4 : Análise de variância para a variável de luminosidade L \*

Fonte de Variação	gl	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível descritivo
Tratamento	1	6,77	6,77	10,56	0,0015
Tempo	4	428,32	107,08	167,06	< 0,0000
Tratamento * Tempo	4	30,02	7,50	11,71	< 0,0000
Resíduo	140	89,73	0,64		
Total	149	554,83			

### Análise da variável cor a

Tabela A5 : Análise de variância para a variável de intensidade de cor a

Fonte de Variação	gl	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível descritivo
Tratamento	1	0,02	0,02	0,38	0,5380
Tempo	4	7,20	1,80	38,13	< 0,0000
Tratamento * Tempo	4	0,38	0,09	2,01	0,0962
Resíduo	140	6,61	0,05		
Total	149	14,21			

### Análise da variável cor b

Tabela A6. : Análise de variância para a variável de intensidade de cor b

Fonte de Variação	gl	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F	Nível descritivo
Tratamento	1	0,00	0,00	0,01	0,9345
Tempo	4	60,79	15,20	35,86	< 0,0000
Tratamento * Tempo	4	28,88	7,22	17,03	< 0,0000
Resíduo	140	59,33	0,42		
Total	149	149,00			

Tabela.A7 : Resultados das comparações entre os tratamentos em cada tempo luminosidade L. \*

<b>Tempo</b>	<b>Fonte de variação</b>	<b>gl</b>	<b>Soma de Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>Nível descritivo</b>
0	Tratamento	1	1,52	1,52	2,37	0,1262
	Resíduo	140	89,73	0,64		
15	Tratamento	1	26,41	26,41	41,20	< 0,0000
	Resíduo	140	89,73	0,64		
30	Tratamento	1	0,47	0,47	0,73	0,3948
	Resíduo	140	89,73	0,64		
45	Tratamento	1	6,59	6,59	10,28	0,0017
	Resíduo	140	89,73	0,64		
60	Tratamento	1	1,80	1,80	2,81	0,0961
	Resíduo	140	89,73	0,64		

Tabela A8 : Resultados das comparações entre os tratamentos em cada tempo cor b

<b>Tempo</b>	<b>Fonte de variação</b>	<b>gl</b>	<b>Soma de Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>F</b>	<b>Nível descritivo</b>
0	Tratamento	1	8,44	8,44	19,92	< 0,0000
	Resíduo	140	59,33	0,42		
15	Tratamento	1	0,19	0,19	0,45	0,5020
	Resíduo	140	59,33	0,42		
30	Tratamento	1	0,19	0,19	0,45	0,5044
	Resíduo	140	59,33	0,42		
45	Tratamento	1	18,44	18,44	43,51	< 0,0000
	Resíduo	140	59,33	0,42		
60	Tratamento	1	1,62	1,62	3,81	0,0528
	Resíduo	140	59,33	0,42		