

ESTUDO DOS PIGMENTOS CAROTENÓIDES QUE OCORREM NA PELE DO PAR
GO (*Lutjanus purpureus* Poey)

LUIZ CARLOS PEREIRA LEMOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

FORTALEZA - 1984

Esta Dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida desde que seja feita de conformidade com as normas de ética científica.

Luiz Carlos Pereira Lemos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM _____

Prof. Jorge Fernando Fuentes Zapata Ph.D.

Prof. Carlos Brunet Martins Ph.D.

Prof. Humberto Ferreira Oriã M.S.

Prof. Masayoshi Ogawa M.S.

A memória de meu PAI

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A minha esposa APARECIDA e meus filhos LUIS e MARCELO pelo sacrifício e compreensão.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO e a SECRETARIA DE AGRICULTURA DO ESTADO DO MARANHÃO pela oportunidade concedida para realização do Mestrado.

À CAPES/PICD pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Professor JORGE FERNANDO FUENTES ZAPATA pela orientação e amizade.

Aos Professores CARLOS BRUNET MARTINS e HUMBERTO FERREIRA ORIÁ, pela atenção e amizade.

Ao Professor GERALDO ARRAES MAIA Coordenador do Curso pela amizade e confiança.

Aos Professores JOSÉ ABREU MATOS, MIRIAM PINHEIRO DE SOUSA e AFRÂNIO ARAGÃO pela ajuda e orientação.

Aos amigos, ISNARD LOPES CASTRO, VICTOR ELIAS MOUCHREK e JOÃO MARTINS NETO, pela ajuda e amizade.

Ao amigo LEONARDO ANTONIO DE MOURA e família pela acolhida, apoio e amizade.

Ao Professor MASAYOSHI OGAWA pela amizade, orientação e colaboração.

À Professora MARIA DE FATIMA ALMEIDA BRAGA do Departamento de Biblioteconomia da UFMA, pela ajuda e colaboração.

Ao Professor ALEXANDRE DE JESUS BOTÃO MELO pela correção do texto.

À amiga GARDENIA RIBEIRO GONÇALVES pela ajuda para realização do mestrado.

À amiga SIMONE ANDRADE MACIEIRA pela ajuda, assim como a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<i>vii</i>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<i>viii</i>
<u>RESUMO</u>	<i>x</i>
<u>ABSTRACT</u>	<i>xi</i>
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	<i>1</i>
2 - <u>REVISÃO DA LITERATURA</u>	<i>3</i>
2.1 - <u>Estrutura dos Carotenóides</u>	<i>4</i>
2.2 - <u>Modo de Ocorrência dos Carotenóides</u>	<i>6</i>
2.3 - <u>Degradação das Substâncias Carotenóides</u>	<i>9</i>
2.4 - <u>Aplicação dos Carotenóides nos Alimentos</u>	<i>11</i>
2.5 - <u>Pigmentos Carotenóides em Produtos Marinhos</u>	<i>12</i>
3 - <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<i>24</i>
3.1 - <u>Desidratação da Amostra</u>	<i>24</i>
3.2 - <u>Extração dos Pigmentos Carotenóides</u>	<i>24</i>
3.3 - <u>Saponificação da Amostra</u>	<i>26</i>
3.4 - <u>Separação dos Pigmentos pela Cromatografia de Coluna</u>	<i>27</i>
3.4.1 - <u>Pigmentos totais</u>	<i>27</i>
3.4.2 - <u>Pigmentos insaponificáveis</u>	<i>27</i>
3.4.3 - <u>Pigmentos saponificáveis</u>	<i>28</i>
3.5 - <u>Cromatografia em Camada Fina</u>	<i>29</i>
3.6 - <u>Quantificação dos Pigmentos Carotenóides</u>	<i>29</i>
3.6.1 - <u>Pigmentos totais</u>	<i>29</i>

	Página
3.6.2 - Pigmentos insaponificáveis.....	30
3.6.3 - Pigmentos saponificáveis.....	31
3.6.4 - Quantificação das frações obtidas pela cromatografia em coluna.....	31
4 - <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	33
4.1 - <u>Espectrofotometria de Carotenóides Separados por Partição em Solventes</u>	33
4.2 - <u>Espectrofotometria dos Carotenóides Separados por Cromatografia</u>	42
4.3 - <u>Quantificação dos Pigmentos Carotenóides</u>	
5 - <u>CONCLUSÃO</u>	51
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	52

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
1 Comprimento de Onda de absorção máxima dos pigmentos carotenóides da pele do pargo, em nanômetros.....	43
2 Valores de R _f s dos pigmentos carotenóides da pele do pargo obtida por cromatografia em camada fina usando-se como agente revelador uma mistura de éter de petróleo - éter etílico (3+2).....	46
3 Conteúdo de pigmentos carotenóides na pele do pargo (mg/100g de pele em éter de petróleo).....	47
4 Valores de absorção máxima (nm) e concentração de pigmentos carotenóides (mg/100g de pele) para o pargo estocado sob diferentes condições.....	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Arrançamento dos grupos metílicos ao redor do centro da molécula básica (R) de um carotenóide, GOODWIN (1954).....	3
2	Estruturas químicas dos carotenos e sua associação com a estrutura da Vitamina A.....	5
3	Alguns pigmentos carotenóides xantofilados...	7
4	Caminho Metabólico da Luteína em Peixes Dourados, proposto por HATA e HATA (1972).....	18
5	Caminho metabólico da zeaxantina em peixes dourados, proposto por HATA e HATA (1972)....	19
6	Caminho metabólico da luteína em peixes dourados, proposto por MATSUNO et alii (1981).....	20
7	Caminho metabólico da zeaxantina em peixes dourados, proposto por MATSUNO et alii (1981).	21
8	Caminho metabólico da luteína em peixes dourados, proposto por KATAYAMA et alii (1970).....	22
9	Amostras de pargo (<u>Lutjanus purpureus</u> Poey), adquiridas no mercado de peixes da praia de Itacema em Fortaleza - Ceará, para análises nos laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará.....	25
10	Fluxograma do processo de extração e análises dos pigmentos carotenóides da pele do pargo..	32
11	Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides totais da pele do pargo em diferentes solventes.....	34
12	Curvas de absorção espectrofotométrica dos	

FIGURA		Página
	<i>pigmentos carotenóides insaponificáveis da pele do pargo em diferentes solventes.....</i>	35
13	<i>Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides saponificáveis da <u>pe</u>le do pargo em diferentes solventes.....</i>	36
14	<i>Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides da pele do pargo em <u>ê</u>ter de petróleo.....</i>	37
15	<i>Curvas espectrofotométricas da primeira <u>fra</u>ção obtida da cromatografia em coluna dos pigmentos carotenóides totais da pele do <u>par</u>go em diferentes solventes.....</i>	38
16	<i>Curvas de absorção espectrofotométrica da <u>se</u>gunda fração obtida da cromatografia de <u>colu</u>na dos pigmentos carotenóides totais da pele do pargo em diferentes solventes.....</i>	39
17	<i>Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides totais e aqueles <u>sepa</u>rados por cromatografia de coluna (1a. e 2a. frações) em <u>ê</u>ter de petróleo.....</i>	40

RESUMO

Neste trabalho foram estudados os pigmentos carotenóides presentes na pele do pargo brasileiro (Lutjanus purpureus Poey).

Os pigmentos foram extraídos com acetona e o extrato concentrado a vácuo, sendo logo então redissolvidos em éter de petróleo (pigmentos totais). Uma alíquota deste extrato foi saponificada com solução alcoólica de hidróxido de potássio a 10%, durante 30 minutos a 60°C. A adição de éter de petróleo e metanol ao extrato permitiu a separação de pigmentos vermelhos (pigmentos saponificáveis), e amarelos (pigmentos insaponificáveis).

Os carotenóides totais, saponificáveis e insaponificáveis foram separados por cromatografia de coluna, utilizando-se óxido de magnésio como adsorvente e éter de petróleo ou éter etílico como eluentes.

O material pigmentado da pele do pargo também foi separado por cromatografia em camada fina registrando-se os valores de R_f.

O comportamento das curvas espectrofotométricas dos pigmentos totais, saponificáveis e insaponificáveis, foi analisado na faixa de comprimento de onda de 550nm a 400nm.

A pele do pargo apresentou duas principais frações de pigmentos carotenóides. Um pigmento vermelho presente em alta concentração (97% dos pigmentos totais), com absorção máxima a 465nm em éter de petróleo e um pigmento amarelo, presente em baixa concentração (3% dos pigmentos totais), com absorção a 465nm, 435nm e 412nm em éter de petróleo. Estes pigmentos apresentaram características físicas compatíveis com os carotenóides vermelhos e amarelos descritos na literatura respectivamente como astaxantina e tunaxantina.

ABSTRACT

Carotenoid pigments in Brazilian red snapper (Lutjanus purpureus Poey) skin were studied as a part of the skin discoloration research.

Fish skin was ground in a mortar and the pigments extracted several times with acetone. The combined extracts were concentrated under vacuum in a rotatory evaporator at 60°C. The pigments were then further extracted and dissolved in petroleum ether (total pigment fraction). An aliquot from this solution was saponified with 10% alcoholic potassium hydroxide solution for 30 min. at 60°C. Solvent partition between methanolic and ethereal phases permitted separation of red (saponifiable pigment fraction) and yellow (unsaponifiable pigment fraction) carotenoids.

The three pigment fractions were then subjected to magnesium oxide column chromatography; using petroleum ether as eluants.

Thin layer chromatography was also used to separate carotenoid pigments, and R_f values were recorded.

Pigment fractions were assessed for spectrophotometric behavior in the range from 550 nm to 400 nm wavelength.

Red snapper skin had two main carotenoid pigments. The major one is a red pigment (about 97% of the total) with an absorbance maximum at 465 nm in petroleum ether. The second one is a yellow pigment (about 3% of the total) with absorbance peaks at 465 nm, 435 nm and 412 nm, in petroleum ether.

The results indicated that red and the yellow fractions obtained (in this study) were similar to the fish carotenoid described in the literatures as astaxanthin and tuna xanthin, respectively.

1 - INTRODUÇÃO

Tem sido notório que o Estado do Ceará, nos últimos 10 anos, tem-se desenvolvido consideravelmente no setor pesqueiro, principalmente no tocante à exploração industrial do pargo (Lutjanus purpureus Poey). A maior parte da área de distribuição deste produto marinho, encontra-se na plataforma em frente aos Estados do Maranhão, Pará e Território do Amapá.

Desde 1970, o volume de desembarque deste produto nos portos de Fortaleza, tem aumentado. No Ceará, a totalidade do pescado desembarcado em 1982 foi da ordem de 22,4 milhões de quilos. Na produção pesqueira de 1982, o setor que mais contribuiu foi o marítimo industrial com 37,3%, seguido do setor continental com 36,4% e, finalmente, o artesanal com 26,2%.

O pargo vermelho ou "Red snapper", tem sua aceitação comprovada no mercado norte americano, fato que justifica a industrialização deste produto pesqueiro. Esta grande aceitação do filê de pargo é decorrente da atrativa coloração vermelha da sua pele e da brancura da sua carne. Não obstante, do ponto de vista tecnológico, tem-se observado que, desde a captura do pargo, até a obtenção do filê congelado, ocorrem transformações que são responsáveis pela diminuição da intensidade da coloração vermelha da sua pele. Este fato justifica a preocupação entre os industriais da pesca com respeito a exportação deste produto, haja vista que a perda de cor da pele do pargo faz com que o preço internacional do produto seja mais baixo ocasionando consequências adversas à economia do Estado do Ceará.

Atualmente, são empregados dois sistemas de pesca do pargo. Um deles é o sistema de pesca feito em caíques, onde os peixes, após a captura, ficam expostos, às condições ambientais por algumas horas, ocasionando desta maneira uma dí

minuição na intensidade da pigmentação da sua pele. No outro, os pargos, após capturados, são congelados imediatamente por imersão, a fim de manter boa qualidade. Entretanto, tem sido comprovada nas próprias indústrias, uma perda de cor, quando estes peixes são submetidos ao descongelamento para fins industriais.

Este trabalho objetiva reunir informação básica sobre os pigmentos carotenóides que ocorrem na pele do pargo com a finalidade de contribuir para a solução deste problema tecnológico.

Os objetivos específicos são:

- a) Separação e identificação dos pigmentos carotenóides responsáveis pela coloração vermelha da pele do pargo.
- b) Determinação quantitativa dos principais pigmentos carotenóides existentes na pele do pargo.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

O termo carotenóides foi definido por Karrer's e aceito pela "Union Internacionale de Chimie" como sendo um grupo de pigmentos, variando do amarelo ao vermelho os quais são largamente distribuídos nos reinos vegetal e animal. Estes pigmentos possuem estrutura alifática ou alicíclica, composta de unidades isoprênicas (usualmente oito) arranjadas de tal maneira que no centro da molécula estão presentes dois grupos metílicos na posição 1,6, enquanto que no outro lado da cadeia os grupos metílicos se encontram na posição 1,5. Os sistemas cromofóricos destas moléculas contêm numerosas ligações duplas conjugadas carbono-carbono, e constituem o esqueleto estrutural básico dos pigmentos carotenóides designado neste trabalho pela letra R.

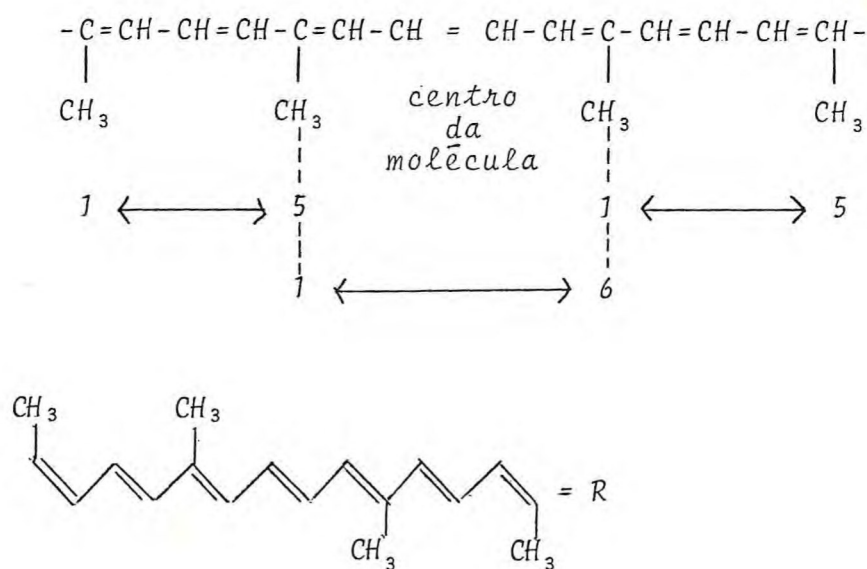


Figura 1 - Arranjamento dos grupos metílicos ao redor do centro da molécula básica (R) de um carotenóide, GOODWIN (1954).

2.1 - Estrutura dos Carotenóides

Quimicamente os carotenóides podem ser divididos em dois grupos:

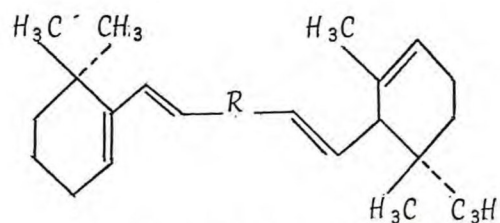
- a) Carotenos - Este grupo está constituído por hidrocarbonetos, que se caracterizam por serem solúveis em éter de petróleo.
- b) Xantofilas - Neste grupo encontram-se os derivados dos carotenos. Trata-se de álcoois, aldeídos, cetonas, epóxidos e ácidos, solúveis em etanol.

Além de sua cor característica estes pigmentos possuem outras funções tais como: atividades de provitamina A, absorção da energia da luz, transporte de oxigênio e outras, EMODI (1978).

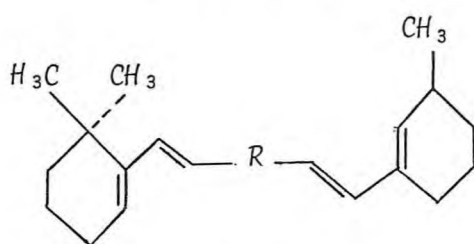
Todos os carotenóides são solúveis em gorduras e lipóides, por esta razão são também chamados pigmentos lipocrômicos. No organismo animal os carotenóides se encontram também dissolvidos na gordura ou combinados com proteínas na fase aquosa, IKAN (1976).

Poucos carotenóides são solúveis em água sendo que aqueles que apresentam esta característica possuem grupos ácidos (grupos carboxílicos, ou enol). Os carotenóides são hábeis formadores de sais alcali solúveis em água ou adquirem propriedades liofílicas pela esterificação com resíduos de açúcares.

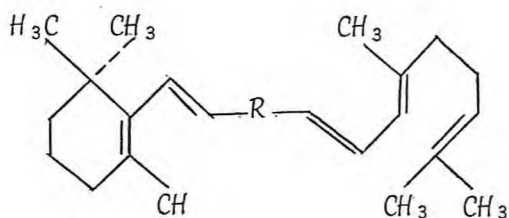
Alguns destes pigmentos são precursores da vitamina A e tem sido denominados provitamina A, desempenhando papel importante no organismo animal. O pigmento beta-caroteno apresenta maior atividade provitamínica porque pode gerar, por hidrólise, duas moléculas de vitamina A (Figura 2). Observando-se as estruturas do alfa, beta e gama-caroteno, pequenas diferenças nas três estruturas são notadas, afetando sobretudo as duplas ligações terminais. Enquanto o beta-caroteno possui dois anéis completos de beta ionona, em cada extremidade da molécula, o alfa e gama caroteno possuem apenas um



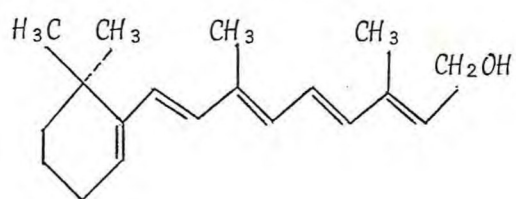
ALFA-CAROTENO



BETA-CAROTENO



GAMA-CAROTENO



RETINOL (vitamina A)

Figura 2 - Estruturas químicas dos carotenos e sua associação com a estrutura da Vitamina A.

anel de beta-ionona. Os alfa e gama carotenos são também provitaminas, mas sua atividade é cerca da metade daquela do beta-caroteno.

Os animais tem a propriedade de converter os compostos da provitamina A em vitamina A por um sistema oxidativo enzimático presente na mucosa do intestino. Entretanto, não se conhece a conversão do caroteno em vitamina A nos vegetais, IKAN (1976).

As xantofilas constituem um grupo mais numeroso (Figura 3), e podem ser classificadas, segundo IKAN(1976), como se segue:

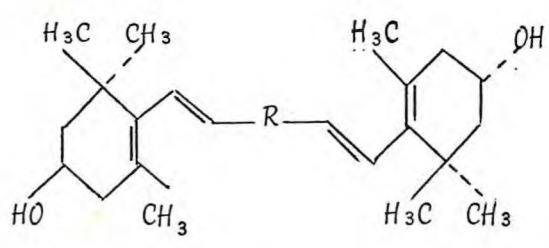
- 1 - Carotenóides Hidroxilados, tais como a criptoxantina, luteína e a zeaxantina. Nestes compostos os grupos hidroxilados podem existir livres ou esterificados.
- 2 - Carotenóides Metoxilados, tal como a rodovibrina.
- 3 - Oxocarotenóides, tais como a capsaxantina e a rodoxantina.
- 4 - Epoxicarotenóides, que existem na natureza como 5,6 e 5,8 epóxido, temos como exemplo a violaxantina e a flavoxantina.
- 5 - Carboxicarotenóides, tais como a bixina e a crocetina.

Quase todos os carotenóides que ocorrem na natureza são tetraterpenóides e tem sido demonstrado que com poucas exceções os carotenóides naturais possuem configuração trans, IKAN, (1976).

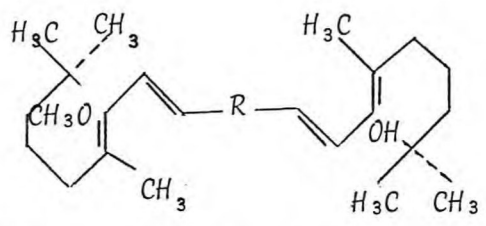
2.2 - Modo de Ocorrência dos Carotenóides

Os pigmentos carotenóides estão largamente distribuídos na natureza. A maior parte deles provém das algas na forma de fucoxantina e das folhas verdes das plantas nas formas de luteína, violaxantina e neoxantina.

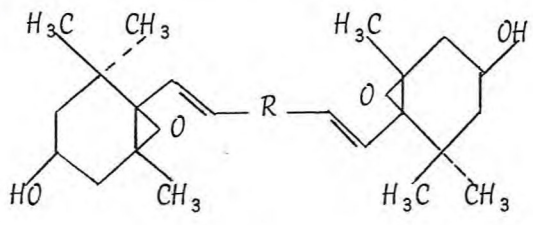
Nos vegetais superiores os carotenóides encontram-se



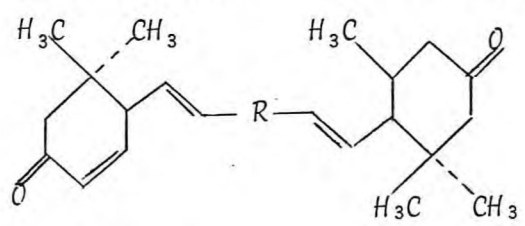
ZEAXANTINA (carotenóide hidroxilado)



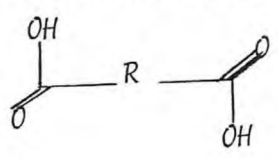
RODOVIBRINA (carotenóide metoxilado)



VIOLAXANTINA (epóxido carotenóide)



RODOXANTINA (oxocarotenóide)



CROCETINA (carboxicarotenóide)

Figura 3 - Alguns pigmentos carotenóides xantofilados.

nas folhas, junto com a clorofila, como cristais ou sólidos amorfos e em muitas outras partes da planta. Tem-se observado em diferentes tipos de abóboras, cenouras (de onde deriva o nome caroteno) e em batatas etc. Nestas hortaliças estes pigmentos ocorrem na forma de hidrocarbonetos (carotenos) e não na forma de xantófilas. Os carotenóides também se encontram em certos frutos como abricós, pêssegos, cítricos, casca de banana madura, pimentas etc. Também são encontrados como os principais pigmentos em certas flores amarelas, laranjas e roxas e em muitos microrganismos (algas roxas, fungos e bactérias fotossintéticas).

Os carotenóides estão também presentes em todos os animais. Enquanto os vegetais e microrganismos sintetizam os seus carotenóides, aqueles existentes nos tecidos animais superiores, são provenientes da dieta e se encontram na fase gordurosa destes tecidos. Sendo assim, os produtos de origem animal tais como: carne, leite, manteiga e gema de ovo, contêm carotenóides nas suas fases lipídicas, WILLSTAETTER (1967).

Os pigmentos carotenóides podem ocorrer em combinações com açúcares e proteínas.

A ocorrência de carotenóides como ésteres de ácidos graxos é conhecida de muito tempo. A capsaxantina ocorre como éster do ácido laúrico em pimentões vermelhos, CLYDESDALE e FRANCIS (1976).

A associação de carotenóides com proteínas é de recente investigação e o estudo destes pigmentos tem-se desenvolvido primariamente em invertebrados. A associação do carotenóide com a proteína, estabiliza o pigmento e também muda sua cor. Por exemplo, a astaxantina que é um carotenóide que possui coloração vermelha, quando complexado com uma proteína toma coloração azul o que é observado na carapaça das lagostas. Um outro exemplo típico de um complexo carotenóide-proteína é a ovoverdina. Esta cromoproteína solúvel em água, ocorre nas ovas das lagostas. No entanto, os complexos carotenóides proteicos, são também conhecidos em algumas folhas

verdes, bactérias frutos e vegetais, CLYDESDALE e FRANCIS (1976).

Os carotenóides ocorrem também em combinações com açúcares reduzidos via ligação glicolítica. Por muitos anos a crocina, que contém duas moléculas do açúcar gentibiose, unida com a crocetina, foi o único pigmento deste tipo conhecido. A crocina é o pigmento principal do açafrão. Entretanto, ultimamente numerosos carotenóides glicosídicos tem sido isolados das bactérias.

2.3 - Degradação das Substâncias Carotenóides

A principal causa da degradação dos carotenóides nos alimentos é a oxidação, sendo que esta reação acontece com maior ou menor severidade, dependendo das condições ambientais. No tecido intacto, a estabilidade do pigmento depende da permeabilidade da célula e da presença de componentes que protejam a mesma. Por exemplo, o licopeno, quando presente no tomate, é muito estável, mas se for extraído e purificado, torna-se instável, CLYDESDALE e FRANCIS (1976).

O descoramento do beta-caroteno segundo dados da literatura, ocorre somente em altas concentrações de oxigênio, TEIXEIRA NETO et alii (1981).

WILLSTAETTER (1967), considera que devido à natureza insaturada dos carotenóides, eles se oxidam rapidamente sobretudo nas duplas ligações, ocorrendo desta maneira a formação de epóxidos. Existem certos indícios de que a oxidação e a degradação subsequente dos carotenóides se iniciam no final da cadeia hidrocarbonada e não no extremo terminal, constituído pelo anel de ionona. Desta maneira a degradação final da molécula do carotenóide determina a formação de uma cetona, que cheira a violetas.

O efeito do tratamento térmico sobre certos carotenóides pode modificar sua estrutura molecular ao mudar as

formas instáveis poli-cis em formas trans, originando as últimas, configurações mono e di-cis instáveis. Durante tais tratamentos há uma alteração na cor dos tecidos vegetais e em sua potência de provitamina A.

A diminuição da cor dos carotenóides causada pela oxidação é um fator importante de deterioração de determinados produtos alimentícios, que contêm estes pigmentos. Tal é o caso por exemplo dos óleos essenciais, que em seu estado natural estão geralmente coloridos pelos carotenóides, porém perdem sua cor devido à oxidação.

Geralmente, os pigmentos carotenóides causam poucos problemas durante o processo de enlatamento dos produtos que os contêm. Entretanto, visto que são lipocromos distribuídos nos cloroplastos próximo à fase oleosa e que estão sempre ligados aos lipídios como ésteres dos ácidos graxos, devem ser tomados certas precauções para evitar alterações da molécula lipídica. Tal deterioração é causada provavelmente pela enzima lipoxidase. Por exemplo, na maceração de folhas verdes metade dos carotenóides são perdidos em 20 minutos à temperatura ambiente, CLYDESDALE e FRANCIS (1976).

O processo de degradação in vitro dos carotenóides de origem vegetal acontece principalmente devido à presença, nos tecidos, de enzimas como a lipoxidase, responsável pela destruição dos carotenóides em vários alimentos. Nos alimentos processados o mecanismo de oxidação é complexo dependendo de vários fatores tais como: presença de oxigênio atmosférico, luz, calor e da presença do pró e antioxidante. Estas reações de oxidação ocorrem pela formação de radicais livres. Também tem sido demonstrado que os carotenóides são mais estáveis em sistemas com alto grau de insaturação, devido aos lipídios do sistema aceitarem radicais livres com maior facilidade que os carotenóides, CLYDESDALE e FRANCIS (1976).

Tem sido discutido o fato de que as gorduras de configuração cis na parte hidrocarbonada da molécula constitui o substrato para a enzima lipoxidase, sem que a posição da

dupla ligação seja crítica, GOODWIN (1954). Segundo este autor a necessidade estrutural para a atividade da lipoxidase é o sistema de grupos metálicos com duplas ligações interrompidas. Desta maneira parece ser necessário que o processo de oxidação da fase gordurosa do sistema esteja em andamento para ser possível a oxidação enzimática indutiva dos carotenóides.

HATA (1967), relata que a oxidação é uma importante causa da descoloração dos pigmentos. Para este autor a oxidação se processa de dois modos, o químico e o enzimático sendo favorecida por fatores tais como: luz, calor, íons metálicos, compostos hemáticos, ácidos graxos insaturados etc.

Segundo TSUKUDA (1974), a oxidação dos pigmentos carotenóides em peixes é favorecida pela presença do ar, luz, calor e principalmente quando estes animais marinhos sofrem traumatismo em seus órgãos durante o processo de captura.

2.4 - Aplicação dos Carotenóides nos Alimentos

Os carotenóides naturais extraídos principalmente da beterraba, tomates, pimentões etc., tem sido empregados como corantes de muitos alimentos, CLYDESDALE e FRANCIS (1976).

Nos Estados Unidos, somente beta-caroteno, beta-apo-8'-carotenal e a cantaxantina, (4,4 diceto-beta-caroteno) são aplicados nos alimentos.

O beta-caroteno foi introduzido como corante nos alimentos em 1954, o apocarotenal em 1960 e a cantaxantina em 1964, EMODI et alii (1976) e EMODI (1978).

Visto que os carotenóides na sua forma pura, são sensíveis a oxidação pela luz e calor, eles devem ser estocados sob vácuo ou gás inerte para prevenir sua rápida degradação e sua utilização comercial parece limitada, a menos que formas marcadamente estáveis destes pigmentos sejam desenvolvidas. O problema se acentua com a pouca solubilidade

destes pigmentos em óleos ou gorduras e sua quase total insolubilidade em água, EMODI (1978).

Dentre as vantagens do uso dos pigmentos carotenóides em alimentos podemos citar: origem natural, estabilidade na faixa do pH da maioria dos alimentos, não afetados por substâncias redutoras como ácido ascórbico, não corrosivos, atividades de vitamina A, e cor altamente desejável na faixa do amarelo ao vermelho. A desvantagem do uso de carotenóides é seu alto custo quando comparado com os pigmentos nitrogenados, faixa de cor limitada e alta sensibilidade a degradação.

O uso de pigmentos carotenóides para intensificar a cor característica de camarões durante o congelamento é descrita por MORAIS et alii (1975).

2.5 - Pigmentos Carotenóides em Produtos Marinhos

Algumas das brilhantes cores da pele dos peixes marinhos, são devidos à existência dos pigmentos carotenóides nos cromatóforos. Estes se constituem um tipo de célula localizadas na derme da pele e ao redor das escamas, que dão coloração características às mesmas. Os pigmentos granulares são inclusões citoplasmáticas dos cromatóforos e representam a verdadeira fonte de cor destes animais. A migração destes grânulos em movimentos de dispersão ou contração dentro da célula é responsável pelas mudanças de cor na pele de alguns peixes. Os pigmentos nos grânulos refletem vários comprimentos de onda de luz e absorvem outros. Somente aqueles que são refletidos são vistos. LAGLER et alii (1962).

Segundo KIBIYA (1967), a agregação centrípeta dos grânulos dentro dos cromatóforos produz uma coloração pálida, ao passo que uma dispersão dos mesmos produz uma coloração escura na pele de alguns peixes.

Nos peixes os pigmentos são quase inteiramente xantofilílicos e existem muito poucas variações de espécie para es

pêcie.

A astaxantina, a luteína, a taraxantina, ou uma mistura destas são, segundo GOODWIN (1954), os únicos pigmentos geralmente presentes na pele dos peixes. De acordo com isto Lonnberg, citado por GOODWIN (1954), postulou que os peixes encontram-se divididos em dois grupos; os que possui luteína e os que contêm carotenóides semelhantes à taraxantina.

Precisamente com estes pequenos números de alternativas é muito difícil prever-se o carotenóide característico em qualquer membro de uma espécie, GOODWIN (1954).

Exemplos de peixes contendo astaxantina esterificada na pele são o salmão do Pacífico norte Onchorhynchus nerka, o dourado marinho Cyclopterus lumpus e o bacalhau de rocha Sebastes marinus, GOODWIN (1954).

Usualmente os peixes costeiros e de água doce apresentam composição mais complexa de carotenóides do que os do oceano, HIRAO (1967).

HATA e HATA (1977 a), observaram que o principal carotenóide existente na pele do peixe dourado é a astaxantina esterificada.

KANEMITSU e AOE (1958 a) encontraram astaxantina no músculo do salmão do Pacífico.

A presença da astaxantina também foi detectada nos músculos dorsal, ventral e caudal de cinco espécies de salmão do Pacífico, KANEMITSU e AOE, (1958 b).

Beta-caroteno, luteína, zeaxantina, pectenoxantina, pectenelone, mitiloxantina e isomitiloxantina foram identificados como os principais pigmentos carotenóides em mexilhões MATSUNO et alii (1981 b).

A composição dos pigmentos carotenóides da pele de quatro espécies de carpa e de duas variedades de peixes dourados foi pesquisada por MATSUNO e MATSUTAKA (1981). Estes autores encontraram que a cintiaxantina era o principal pigmento na carpas, porém nos peixes dourados prevaleciam os ceto carotenóides, tais como: astaxantina, alfa e beta doradexan

tina e idoxantina.

Os principais carotenóides encontrados na pele do half beak, Hemiramphus sajari foram a tunaxantina e a zeaxantina, já na mandíbula cuja pele apresenta coloração vermelha, houve predominância da zeaxantina, astaxantina, e a beta-doradexantina, MATSUNO e OOKUBO (1981).

Segundo TSUKUDA (1963), camarões de profundidade contêm astaxantina, astaceno e uma substância considerada como sendo, beta-caroteno. Sendo a astaxantina esterificada o maior pigmento encontrado, a quantidade de astaceno formada a partir da astaxantina foi quantitativamente pequena, e a concentração do pigmento semelhante ao beta-caroteno muito resumida.

TSUKUDA e AMANO (1966 a), estudando o conteúdo de pig^{mentos} carotenóides em dezoito peixes vermelhos japoneses encontraram que os os carotenóides majoritários nestas espécies são a astaxantina e a tunaxantina.

TSUKUDA e AMANO (1966 b), ao estudarem a descoloração sofrida por três espécies de peixes japoneses, durante estocagem a baixas temperaturas, observaram que a astaxantina encontrada no tecido desses peixes é menos estável que a tunaxanti^{na}, e que a estabilidade destes pigmentos difere com a espēcie.

A astaxantina e a tunaxantina foram os dois maiores pigmentos carotenóides encontrados na pele dos peixes dourados e guarnard, TSUKUDA e AMANO (1966 c).

TSUKUDA (1980), estudando a composição dos pigmentos carotenóides em peixes da baía de Tokyo encontrou que a pele continha tunaxantina, luteína, zeaxantina e outros, ao passo que os carotenóides do músculo foram principalmente do tipo epóxido.

Em estudos realizados por HIRAO et alii (1963 a), com peixe dourado e carpa colorida, foi detectada a presença de luteína e de um carotenóide vermelho semelhante ao astaceno.

HIRAO et alii (1963 b), alimentando peixes dourados

japoneses com dietas com altas concentrações em astaxantina, encontraram um decréscimo dos pigmentos totais da pele desses peixes, indicando que esta espécie não absorve astaxantina da dieta e que o pigmento vermelho na sua pele provavelmente não corresponde a astaxantina.

HIRAO *et alii* (1969), também relataram que os carotenóides predominantes na pele dos peixes são: a astaxantina que é comum em peixes vermelhos, a luteína, em peixes de água doce, e a tunaxantina em peixes dos gêneros Scombrina, Caragina e Percina. Os mesmos autores citam alguns outros carotenóides comuns em certos grupos de peixes, muito embora suas propriedades químicas não estejam ainda elucidadas.

O maior pigmento carotenóide encontrado na pele da enchova japonesa, foi designado como enchovaxantina, entretanto a identidade deste pigmento coincide com a zeaxantina pela comparação de suas propriedades físicas e químicas. A presença de outros pigmentos como beta-caroteno e astaxantina também foi detectada; MATSUNO *et alii* (1973 b).

Nos estudos realizados por LEE e KIM (1971), com mexilhões do mar (Mytilus edulis) foram identificados beta-caroteno, luteína, zeaxantina e astaceno, junto com outros pigmentos denominados pelos autores de mitiloxantina. Estes autores observaram que os pigmentos xantofílicos e seus ésteres são dominantes nesta espécie, enquanto que os carotenos são minoritários.

FONTAINE (1962), examinando os pigmentos da pele da Ophiocominia nigra, observaram que os mesmos possuíam espectro de absorção similar ao caroteno e à luteína.

A astaxantina e seus ésteres tem sido identificados como os maiores carotenóides (90%) existentes no exoesqueleto dos caranguejos de rio, sendo que a proporção relativa dos pigmentos neste material consistia de 49,4% de éster de astaxantina, 40,3% de astaxantina e 10,3% de astaceno, CHEN e MEYER (1982 a 1982 b).

MATSUNO *et alii* (1973 a), estudando os pigmentos caro

tenoide da carapaça, ovos, hepatopâncreas, e ovários de la gostas japonesas (Panulirus japonicus), encontraram que na carapaça existem nove tipos de pigmentos carotenóides na for ma livre ou esterificada que estão presentes como: beta-caroteno, equinenona, cantaxantina, foenicoxantina, luteína, zeaxantina, cintiaxantina, 4-ceto-zeaxantina e astaxantina. Nos ovários, uma série de ceto-carotenóides denominados cantaxantina, foenicoxantina, 4-ceto-zeaxantina e astaxantina. Nas ovas, existem somente carotenóides não esterificados que são a astaxantina, beta-caroteno, luteína zeaxantina e cintiaxantina. Enquanto que hepatopâncreas o beta-caroteno foi o carotenóide dominante.

A astaxantina foi o carotenóide principal existente na carapaça, ovos e ovários deste produto marinho.

EVELYN (1967), pesquisando pigmentos carotenóides em salmão sockeye (Oncorhynchus nerka) concluiu que a pele desse peixe continha dois pigmentos xantofílicos esterificados que não correspondiam a astaxantina.

A presença de pigmentos carotenóides nos olhos de peixes de várias espécies tem sido reportada por GOODWIN (1954), sendo que a astaxantina e um outro pigmento semelhante a taraxantina foram os carotenóides detectados com mais frequência neste órgão.

Os carotenóides não são amplamente distribuídos nos músculos dos peixes, mas a astaxantina tem sido encontrada nos músculos dos salmões de rocha e de rio, GOODWING (1954).

As xantofilas não esterificadas ocorrem nas ovas e ovários de muitos peixes. O beta-caroteno tem sido encontrado em vários órgãos dos peixes, no entanto ele é o constituinte universal das ovas dos peixes, embora presentes em poucas quantidades, GOODWING (1954).

Embora poucos trabalhos tenham sido realizados sobre a origem dos carotenóides em peixes, parece razoavelmente certo que eles são de origem alimentar, no entanto não são estocados sem alteração em sua estrutura.

Muitas tentativas têm sido feitas para determinar o caminho tomado pelos carotenóides, no organismo animal. Tem sido encontrado que parte desses pigmentos são excretados, sem que ocorram mudanças na estrutura do carotenóide, enquanto que o remanescente é absorvido. Os carotenóides são depositados nos tecidos gordurosos, tecidos nervosos, órgãos internos etc., ou convertidos em outras substâncias, as quais frequentemente cumprem importantes funções no organismo animal como por exemplo a vitamina A.

Com a finalidade de determinar qual o carotenóide que é metabolizado para astaxantina, MATSUNO et alii (1981) alimentaram por um período de trinta dias peixes dourados japoneses com luteína e zeaxantina. Na pele dos peixes alimentados com zeaxantina, as quantidades desta e as de beta-caroteno-triol, beta-doradexantina e astaxantina aumentaram significativamente. Por outro lado, quando os peixes foram alimentados com luteína, houve um aumento da luteína, 3-epiluteína, alfa-caroteno-triol e da alfa-doradexantina, enquanto que a quantidade de astaxantina decresceu. Estes resultados estão compatíveis com o caminho metabólico proposto por HATA e HATA (1972), (figuras 4 e 5). Além disso, novos intermediários, como 3-epiluteína e o alfa caroteno-triol tem sido reportados na conversão da luteína em alfa-doradexantina. Estes autores concluíram que as vias metabólicas da luteína e zeaxantina são respectivamente aquelas incluídas nas figuras 6 e 7. Para os pesquisadores a não existência da beta-doradexantina e a diminuição na quantidade de astaxantina nesses peixes alimentados com luteína é devido a estes peixes não serem capazes de converter a alfa-estrutura na beta-estrutura. Eles concluíram também que este esquema metabólico contradiz ao proposto por KATAYAMA et alii (1970). (Figura 8).

A função dos pigmentos carotenóides em peixes tem sido difícil de determinar. Entretanto isto não tem impedido os naturalistas de atribuir várias funções para a coloração de peixes vivos. As principais funções da coloração tem sido agrupados em trabalhos de Colt, citados por LAGLER (1962),

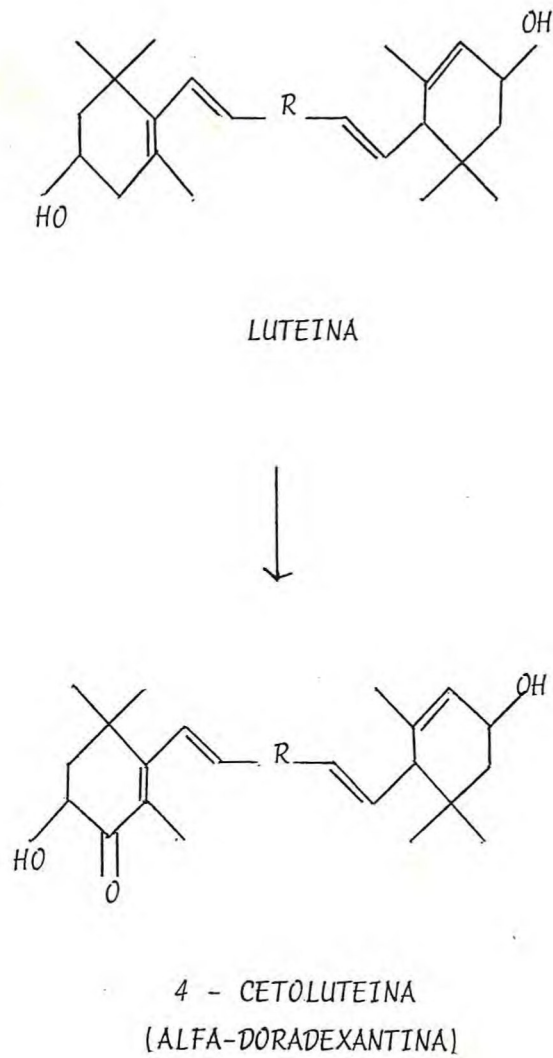


Figura 4 - Caminho metabólico da luteína em peixes dourados, proposto por HATA e HATA (1972).

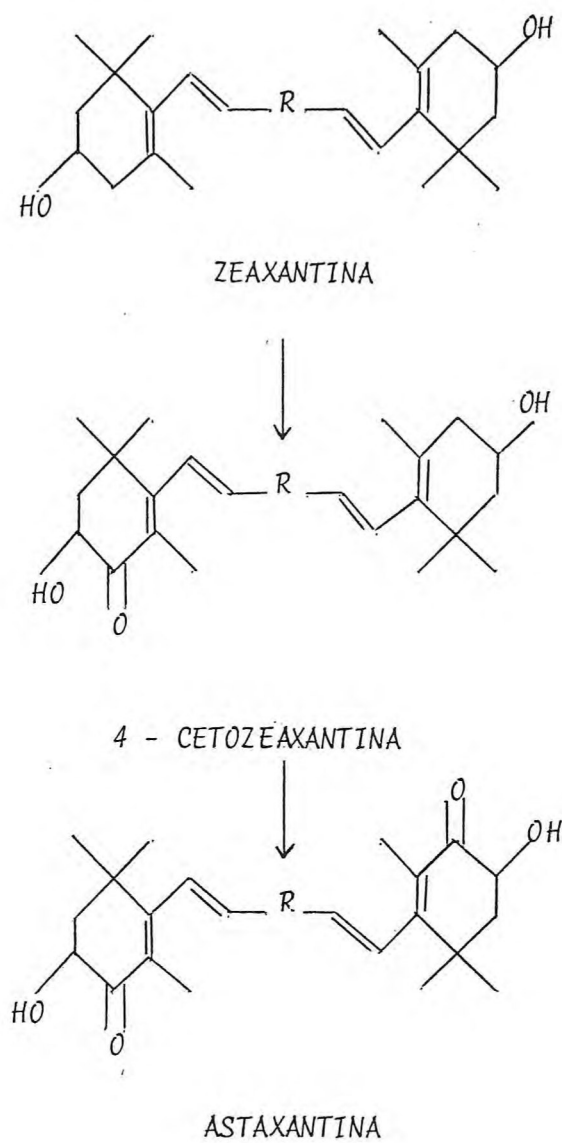


Figura 5 - Caminho metabólico da zeaxantina em peixes dourados, proposto por HATA e HATA (1972).

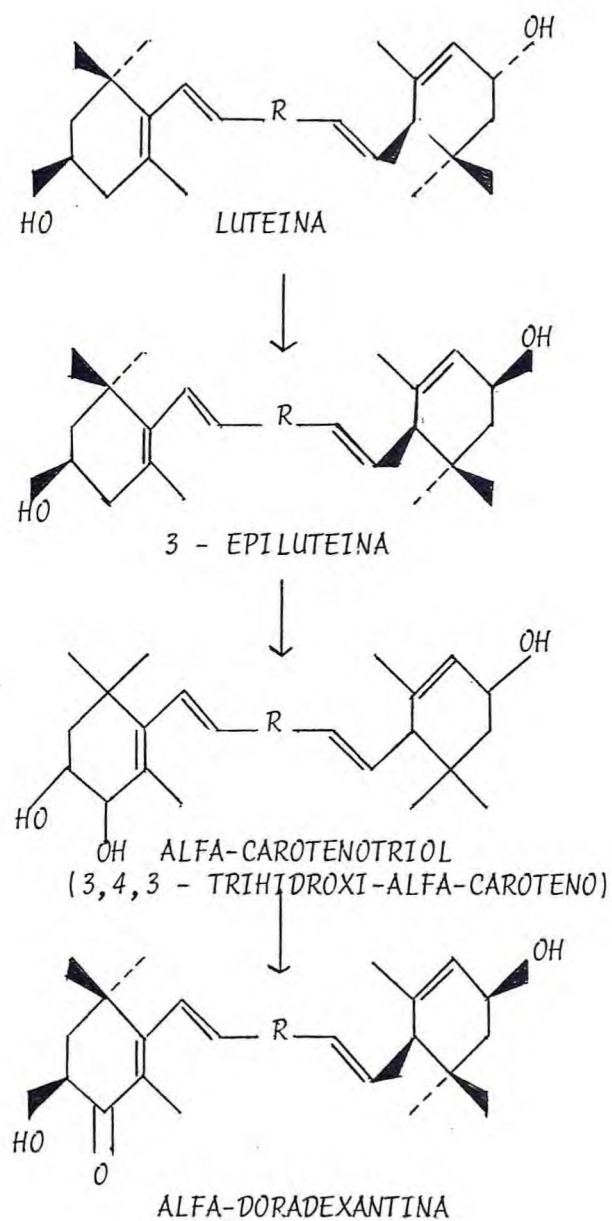


Figura 6 - Caminho metabólico da luteína em peixes dourados, proposto por MATSUNO *et alii* (1981).

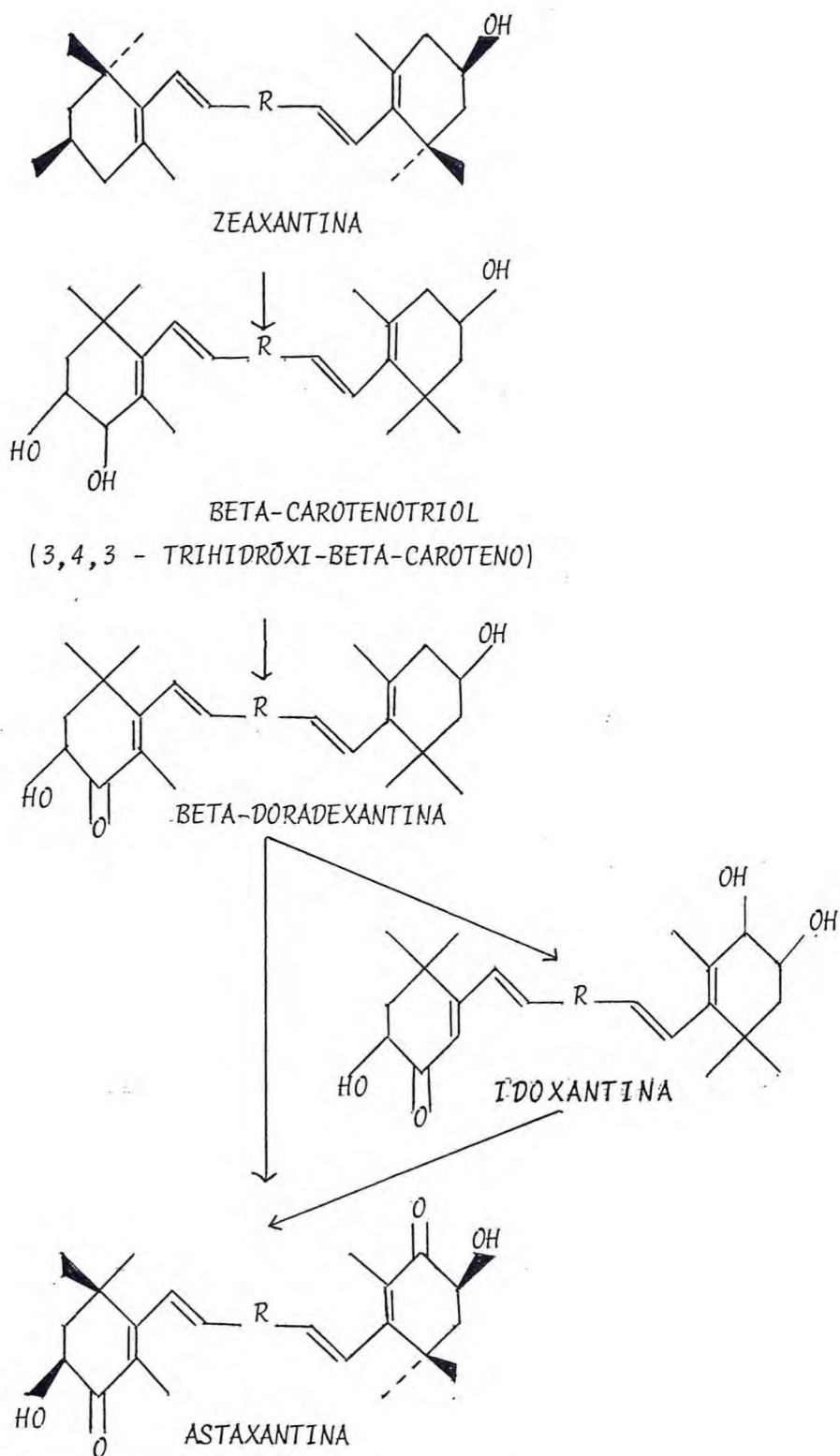


Figura 7 - Caminho metabõlico da zeaxantina em peixes dourados, proposto por MATSUNO *et alii* (1981).

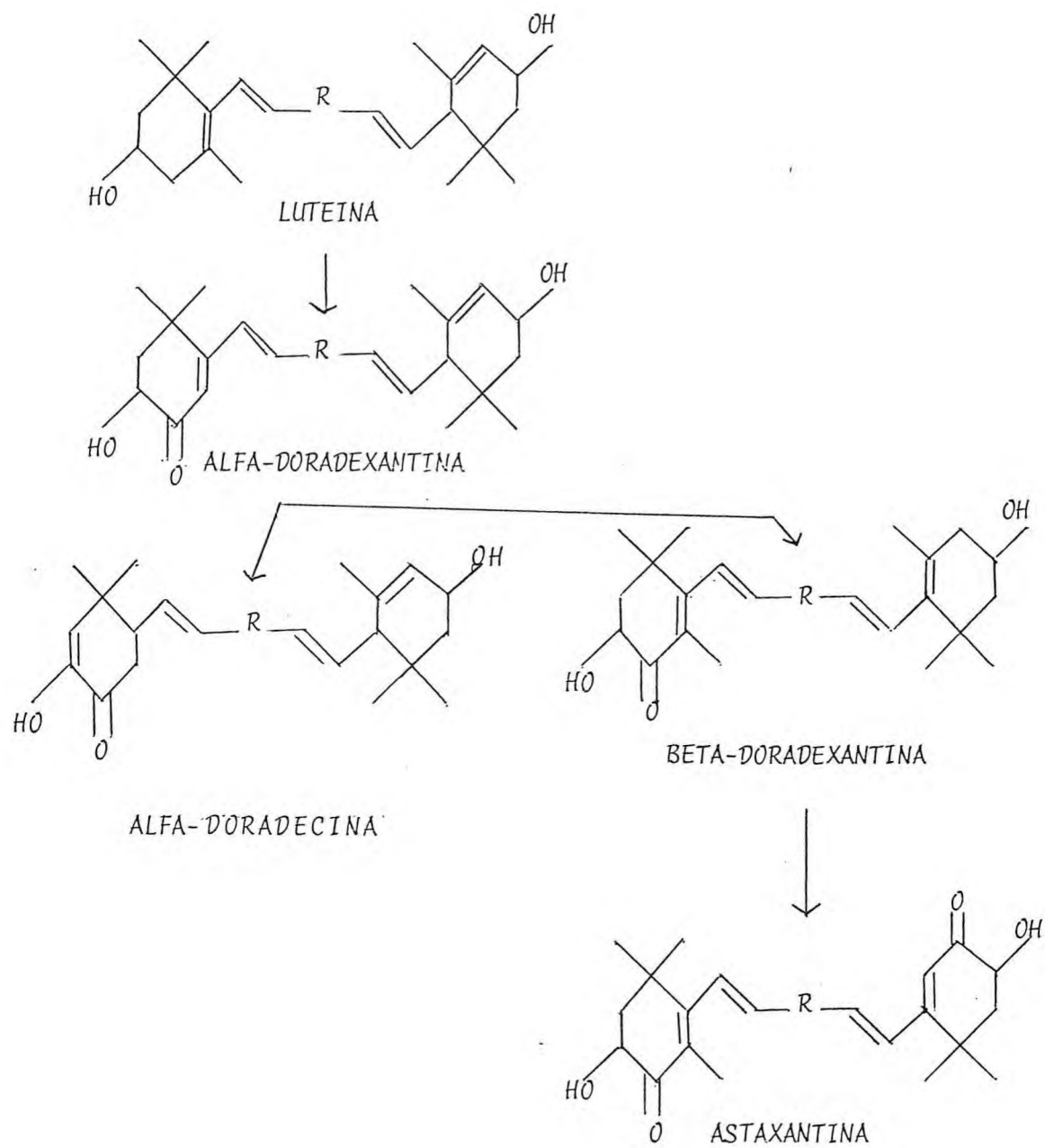


Figura 8 - Caminho metabólico da luteína em peixes dourados, proposto por KATAYAMA *et alii* (1970).

Trabalhos de Summer e Fox, citados por GOODWIN (1954), indicam que os carotenóides desempenham um papel importante na fotorresposta de alguns peixes.

Alguns peixes mantêm seus conteúdos de carotenóides em diferentes meios óticos, embora possam sofrer alteração na coloração devida à contração e expansão dos cromatóforos, sem qualquer variação quantitativa do conteúdo em carotenóides nestas células. Em peixes do gênero Girella, por outro lado, há uma tendência à perda de xantofila em cativo, sendo que esta ocorre mais rapidamente quando o peixe se encontra sobre um fundo branco, do que sobre um fundo colorido.

É muito mais conhecida a distribuição e função dos carotenóides nos cromatóforos nos peixes de água doce que peixes de água salgada, GOODWIN (1954). Segundo este autor, os pigmentos carotenóides se mobilizam durante a reprodução. O dourado marinho mobiliza astaxantina do fígado para a pele e músculo durante o período de desova e as fêmeas do Fundulus parvinnis transferem xantofilas livres para os ovos amadurecidos e por momentos os machos aumentam o teor de astaxantina em suas peles.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de pargo usadas neste estudo foram adquiridas no mercado de peixes da praia de Iracema em Fortaleza-Ceará, onde os pescados são conservados em gelo, depois transportados para os laboratórios do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, foram preparadas para as análises. A figura 9 mostra o aspecto dos peixes utilizados neste estudo.

3.1 - Desidratação da Amostra

No laboratório, procedeu-se à pesagem do peixe para, logo em seguida ser retirada sua pele, que também foi pesada. Para separação dos pigmentos carotenóides da pele, adicionou-se o agente desidratante, sulfato de sódio anidro e deixada macerar em um gral de porcelana de 50ml aproximadamente duas horas protegida da luz, TSUKUDA (1974).

3.2 - Extração dos Pigmentos Carotenóides

A pele do peixe desidratada foi extraída com sucessivas porções de 20ml de acetona, até que a pele do pargo ficasse totalmente incolor. O extrato, contendo os carotenóides, foi então evaporado em um evaporador rotativo Quimis, modelo 344-1, com a finalidade de concentrar os pigmentos e recuperar o solvente.

Os pigmentos concentrados foram então transferidos para éter de petróleo (p. e. 40°C - 60°C), num balão volumétrico de 100ml. Logo após adicionou-se uma pequena quantidade de



FIGURA 9 - Amostras de pargo (*Lutjanus purpureus* Poey) adquiridas no mercado de peixes da praia de Iracema em Fortaleza-Ceará, para análises no laboratório do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, Escala 1:4.

sulfato de sódio anidro e nitrogênio gasoso para substituir o ar do balão, estocando-se os pigmentos na geladeira para análises posteriores.

3.3 - Saponificação da Amostra

Uma alíquota de 25ml da solução contendo os pigmentos totais, em éter de petróleo, foi retirada para um erlemmeyer de 250ml, sendo adicionada a mesma 20ml de uma solução de hidróxido de potássio a 10% em metanol. A mistura foi aquecida a temperatura de aproximadamente 60°C por 30 minutos, usando-se um sistema com condensador de refluxo.

Após completa saponificação, a mistura foi transferida cuidadosamente para um funil de separação de 500ml, logo em seguida foram adicionados a mesma 30ml de éter de petróleo seguidos de aproximadamente 150ml de água, ocorrendo então a separação de duas fases. A fase superior, continha principalmente os pigmentos insaponificáveis. Esta fase é também chamada de etérea ou epifásica, enquanto que a fase inferior também chamada de fase metanólica ou hipofásica, continha principalmente os pigmentos saponificáveis.

A fase etérea foi então repetidamente extraída com metanol e a fase metanólica, sucessivamente extraída com éter de petróleo, sendo os extratos apropriados foram combinados.

A solução contendo os pigmentos insaponificáveis, várias vezes lavada com água, foi posteriormente desidratado sobre sulfato de sódio anidro, concentrada a vácuo e aferida em um balão volumétrico para 100ml com éter de petróleo, sendo esta solução imediatamente estocada na geladeira.

A solução que continha os pigmentos saponificáveis, adicionou-se água e levou-se a um pH neutro, pela adição de ácido clorídrico, para, logo em seguida, ser extraída com éter etílico. O extrato etéreo foi então lavado várias vezes com água. Esta solução depois de evaporada até a secura e dissolvida em éter de petróleo, veio a ser aferida para

100ml em balão volumétrico e, em seguida também estocada na geladeira.

3.4 - Separação dos Pigmentos Pela Cromatografia de Coluna

3.4.1 - Pigmentos totais

A separação destes pigmentos foi realizada em uma coluna cromatográfica de vidro, de 5mm de diâmetro interno e 100cm de altura, empacotada até a altura de aproximadamente 46cm, usando-se como adsorvente óxido de magnésio para cromatografia.

A coluna foi lavada várias vezes com éter de petróleo antes de se colocar na mesma o material a ser analisado. Cinco milímetros dos pigmentos totais em éter de petróleo, provenientes da concentração de 30ml da solução inicial, foram colocados na mesma. Após os pigmentos serem adsorvidos na coluna, adicionou-se éter de petróleo, o que ocasionou o deslocamento de uma fração com coloração amarelo citrino. Continuou-se a adicionar solvente, até que este componente tenha sido totalmente eluído. O pigmento coletado após concentrado a vácuo em um evaporador rotativo, aferiu-se o volume com éter de petróleo em balão volumétrico de 100ml, sendo em seguida estocado na geladeira para posteriores determinações. Um outro componente da mistura de pigmentos de cor avermelhada, que permaneceu no topo da coluna deslocou-se com éter etílico. Este pigmento arrastado coletado, concentrou-se a vácuo até a secura, sendo então dissolvido em éter de petróleo, para depois ser aferido em balão volumétrico de 200 ml e, logo em seguida estocada na geladeira.

3.4.2 - Pigmentos insaponificáveis

A separação destes pigmentos realizou-se numa coluna cromatográfica de 5mm de diâmetro e 30cm de altura, a qual empacotada até uma altura de aproximadamente 15cm, usando-se como adsorvente óxido de magnésio.

A coluna depois de, lavada várias vezes com éter de petróleo, adicionou-se o material para análise. Cinco mililitros da solução dos pigmentos insaponificáveis em éter de petróleo, provenientes da concentração de 50ml da solução inicial, foram adicionados à coluna cromatográfica. Adsorvida esta alíquota na coluna, a mesma foi eluída com éter de petróleo, coletando-se um pigmento com coloração amarelo citrino que veio a ser, concentrado a vácuo. Aferida em balão volumétrico de 50ml com éter de petróleo a solução foi estocada para posteriores determinações.

3.4.3 - Pigmentos saponificáveis

A separação destes pigmentos foi feita numa coluna cromatográfica de 5mm de diâmetro interno e 100cm de altura. A coluna foi empacotada até a altura de aproximadamente 30cm, usando-se como adsorvente óxido de magnésio.

Uma vez empacotada, a coluna foi lavada várias vezes com éter de petróleo para logo em seguida ser adicionado o material para análise. Cinco mililitros da solução dos pigmentos saponificáveis em éter de petróleo, provenientes da concentração de 30ml da solução inicial destes pigmentos, foram adicionados à coluna cromatográfica. Uma vez adsorvidos na coluna, os pigmentos carotenóides, foi adicionado a mesma, éter de petróleo, coletando-se a seguir um pigmento amarelo citrino, que após coletado, concentrado a vácuo veio a ser aferido em balão volumétrico de 100ml com éter de petróleo. Estocou-se esta solução na geladeira sob atmosfera de nitrogênio gasoso, para posteriores determinações. Uma outra fração, com coloração avermelhada, que ficou no topo da coluna foi então arrastada pela adição de éter etílico. Esta fração

então coletada e evaporada até a secura dissolveu-se em éter de petróleo aferiu-se em balão volumétrico de 200ml e depois estocada na geladeira sob atmosfera de nitrogênio gasoso para outras determinações.

3.5 - Cromatografia em Camada Fina

A Cromatografia em camada fina foi feita para os pigmentos totais e pigmentos saponificáveis e insaponificáveis obtidos pelo processo de partição com solvente e pela cromatografia em coluna.

Esta cromatografia foi realizada em placas de sílica gel Merck 5x10 F₂₅₄, usando-se como solvente de eluição uma mistura de 60% de éter de petróleo com 40% de éter etílico.

Com o auxílio de um tubo capilar as amostras foram colocadas nas placas cromatográficas. Em seguida procedeu-se a revelação destas em uma cuba cromatográfica de vidro saturada com a mistura de solventes. O processo foi detido quando o solvente migrou até aproximadamente 1cm da borda superior das placas. Os valores de R_fs foram calculados a partir das distâncias de migração do solvente e dos pigmentos localizados pelas suas cores características sobre a placa de sílica gel.

3.6 - Quantificação dos Pigmentos Carotenóides

3.6.1 - Pigmentos totais

A solução contendo os pigmentos totais sofreu diluição de 1 para 50 com éter de petróleo em balão volumétrico de 50ml. Sendo a mesma colocada em uma cubeta de 1cm de espessura para determinação do comprimento de onda de absorção máxi

ma. Utilizou-se um espectrofotômetro visível-ultravioleta, Varian modelo 634-S conectado a um registrador Perkin-Elmer, Coleman 165. A absorvância da amostra foi registrada na faixa de 550 a 400nm de comprimento de onda, contra um branco contendo o solvente éter de petróleo.

A quantificação dos pigmentos totais em éter de petróleo, foi calculada pela fórmula segundo TSUKUDA (1974). Para cálculo dos pigmentos totais foi usado o coeficiente de extinção $E_1^{1\%}$ de 2400.

$$\text{Carotenóides totais} = \frac{A \times V(\text{ml}) \times \text{F.D.}(\text{ml}) \times C}{w} = \text{mg\%}$$

onde:

$$C = \frac{1000}{E_1^{1\%} \text{ cm}}$$

A = Absorvância

V = Volume de aferição da Amostra (ml)

F.D. = Fator de Diluição (ml)

w = Peso da Amostra (g)

$E_1^{1\%}$ = Coeficiente de Extinção
1 cm

3.6.2 - Pigmentos insaponificáveis

Da solução que continha principalmente os pigmentos insaponificáveis ou epifásica retirou-se uma alíquota de 20ml para um balão volumétrico de 10ml, completando-se o volume com éter de petróleo. Desta solução, foi retirada uma alíquota e colocada em uma cubeta de 1cm de espessura e feita a curva de absorvância do mesmo modo como feito anteriormente para os pigmentos totais.

A quantificação dos pigmentos insaponificáveis calculou-se também pela fórmula segundo TSUKUDA (1974), usando-se

porém o coeficiente de extinção $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 2000.

3.6.3 - Pigmentos saponificáveis

Da solução que continha principalmente os pigmentos saponificáveis ou hipofásica, retirou-se um alíquota de 20ml para um balão volumétrico de 200ml, completando-se o volume com éter de petróleo. Desta solução, retirou-se uma pequena porção que foi colocada em uma cubeta de 1cm de espessura e feita a curva de absorbância da mesma forma, como feita para os pigmentos totais.

A quantificação dos pigmentos saponificáveis calculou-se pela fórmula segundo TSUKUDA (1974), usando-se o coeficiente de extinção $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ de 2000.

3.6.4 - Quantificação das frações obtidas pela cromatografia em coluna

A quantificação das frações obtidas pela cromatografia em coluna, foi feita da mesma maneira já descrita para os pigmentos separados por partição. A fórmula segundo TSUKUDA (1974), empregou-se para este cálculo, usando-se o coeficiente de extinção de 2000 para pigmentos separados como primeira fração dos pigmentos totais, e de 2400 para os pigmentos separados como segunda fração dos pigmentos totais.

O fluxograma do processo analítico global é apresentado na figura 10.

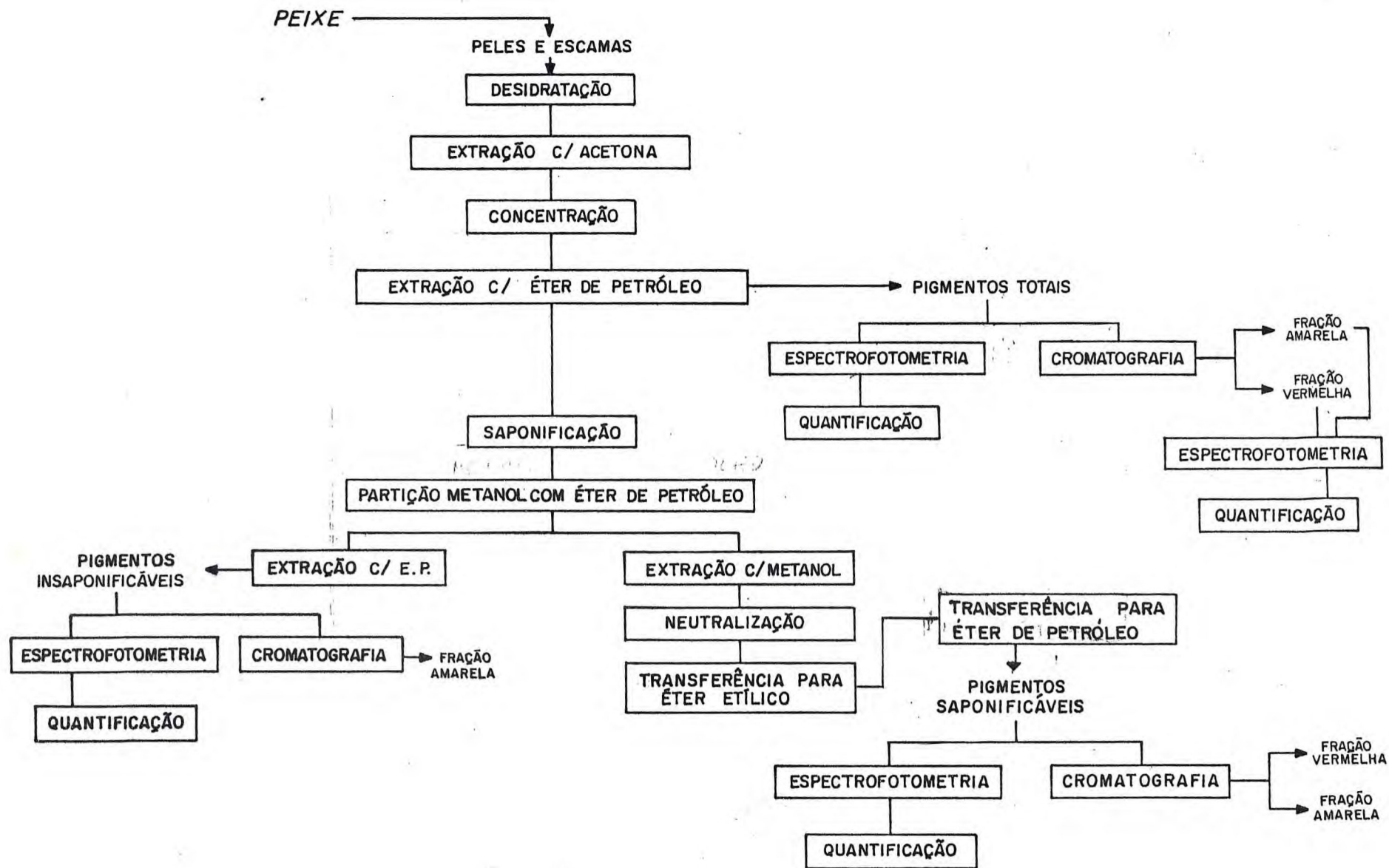


FIGURA 10 - Fluxograma do processo de extração e análises dos pigmentos carotenóides da pele do pargo.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tipo de pargo analisado neste estudo, estava constituído por exemplares de peso variável, apresentando uma média de aproximadamente 1300g por peixe, mantido no gelo por 10 dias após a captura. A média de peso de pele destes peixes foi de 68g, representando cerca de 5,4% do peso do peixe inteiro. A pele apresentou-se intensamente pigmentada de vermelho, especialmente na cabeça e ao redor das nadadeiras.

4.1 - Espectrofotometria de Carotenóides Separados por Partição em Solventes

As curvas de absorção dos pigmentos totais da pele do pargo, em diferentes solventes, são apresentados na figura 11.

Em éter de petróleo os pigmentos totais do pargo, apresentaram um pico de absorção máximo a 465nm e uma deformação da curva aproximadamente a 443nm, figuras 11, 14 e 17. TSUKUDA e AMANO (1966 a), estudando o comportamento das curvas espectrofotométricas de peixes vermelhos japoneses, acharam valores de absorção máxima a 470 e 440nm para os pigmentos totais em éter de petróleo. OGAWA et alii (1973), em estudo espectrofotométrico dos pigmentos carotenóides do pargo brasileiro, encontraram dois picos a 470 e 440nm em éter de petróleo. Os valores obtido neste estudo são similares aos reportados por esses autores.

O comportamento espectrofotométrico dos grupos cromóforos, dos pigmentos carotenóides do pargo, em diferentes solventes, também podem ser observados nas figuras 11, 12, 13, 15 e 16 e resumidas da seguinte maneira. Tomando-se como ba

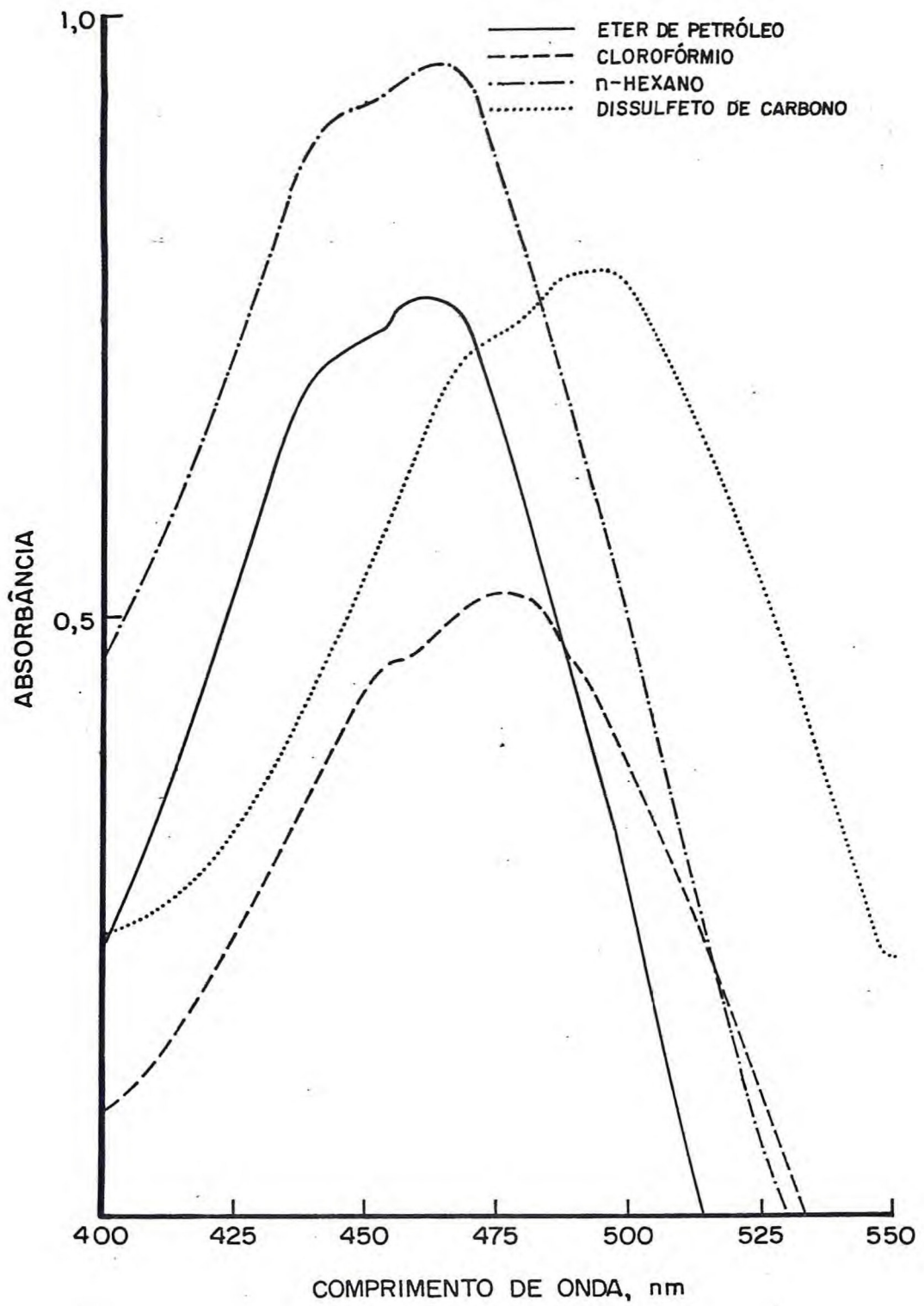


Figura 11- Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides totais de peles de pargo em diferentes solventes.

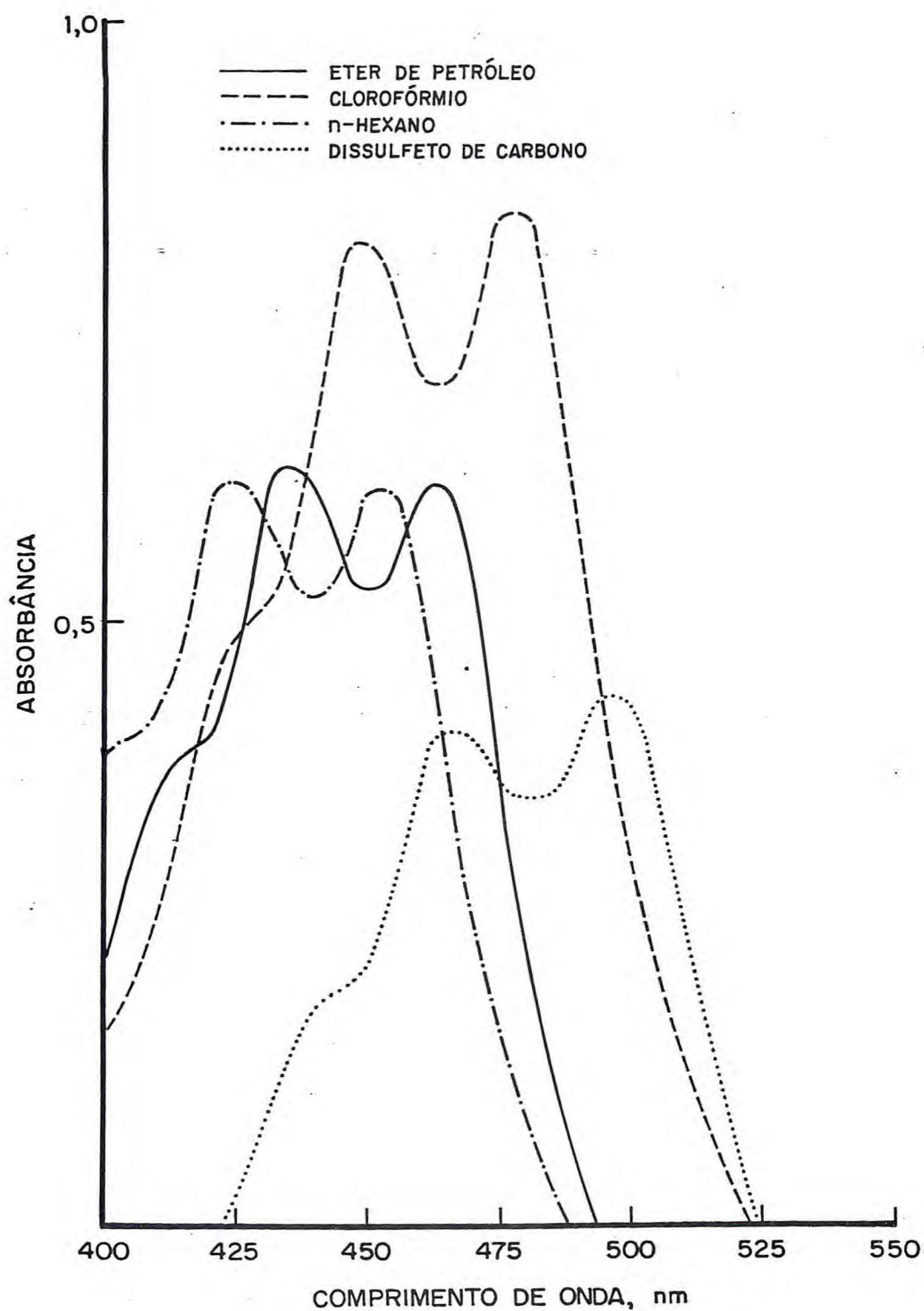


Figura 12- Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides insaponificáveis da pele do pargão em diferentes solventes.

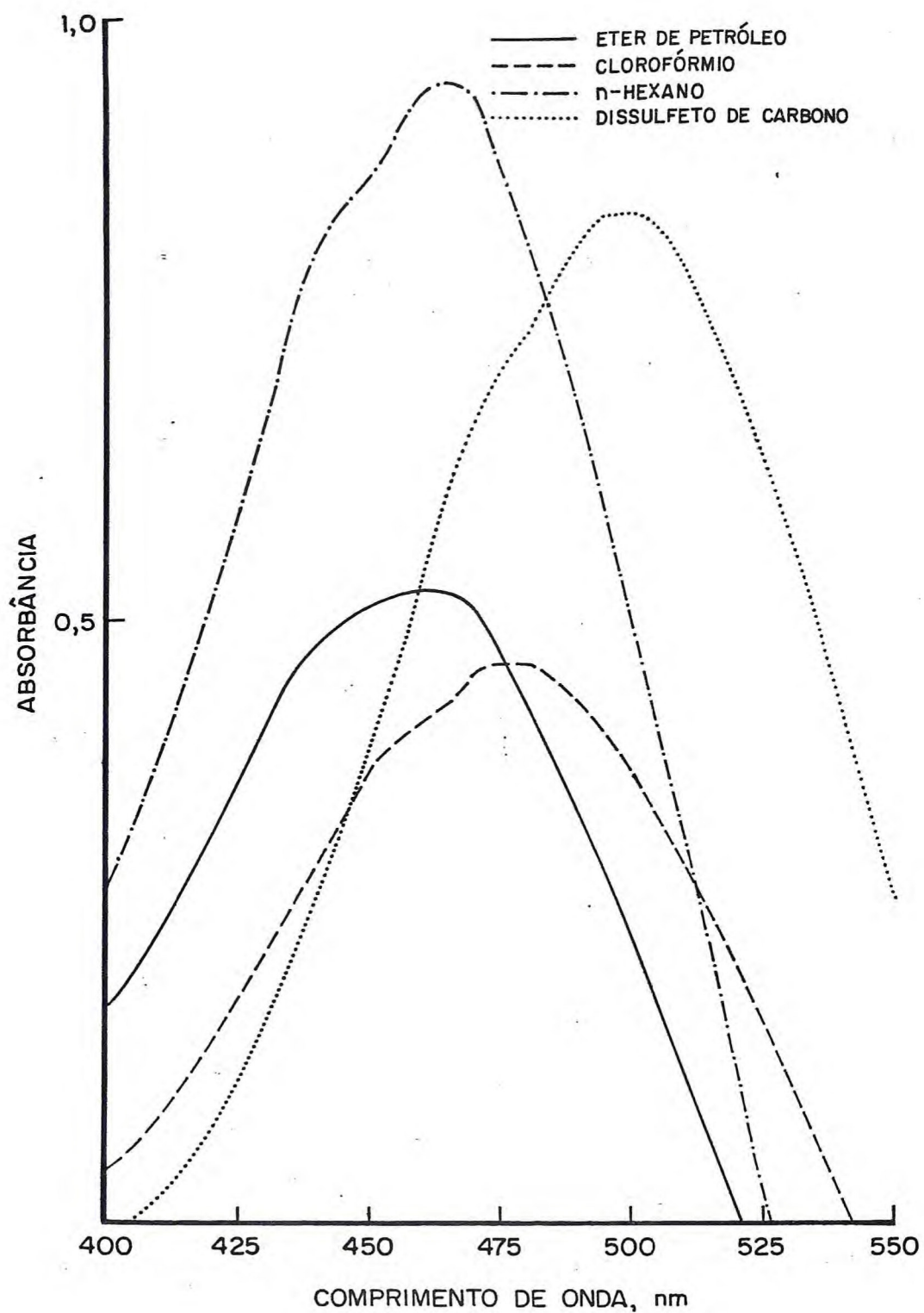


Figura 13 - Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides saponificáveis da pele do bapango em diferentes solventes.

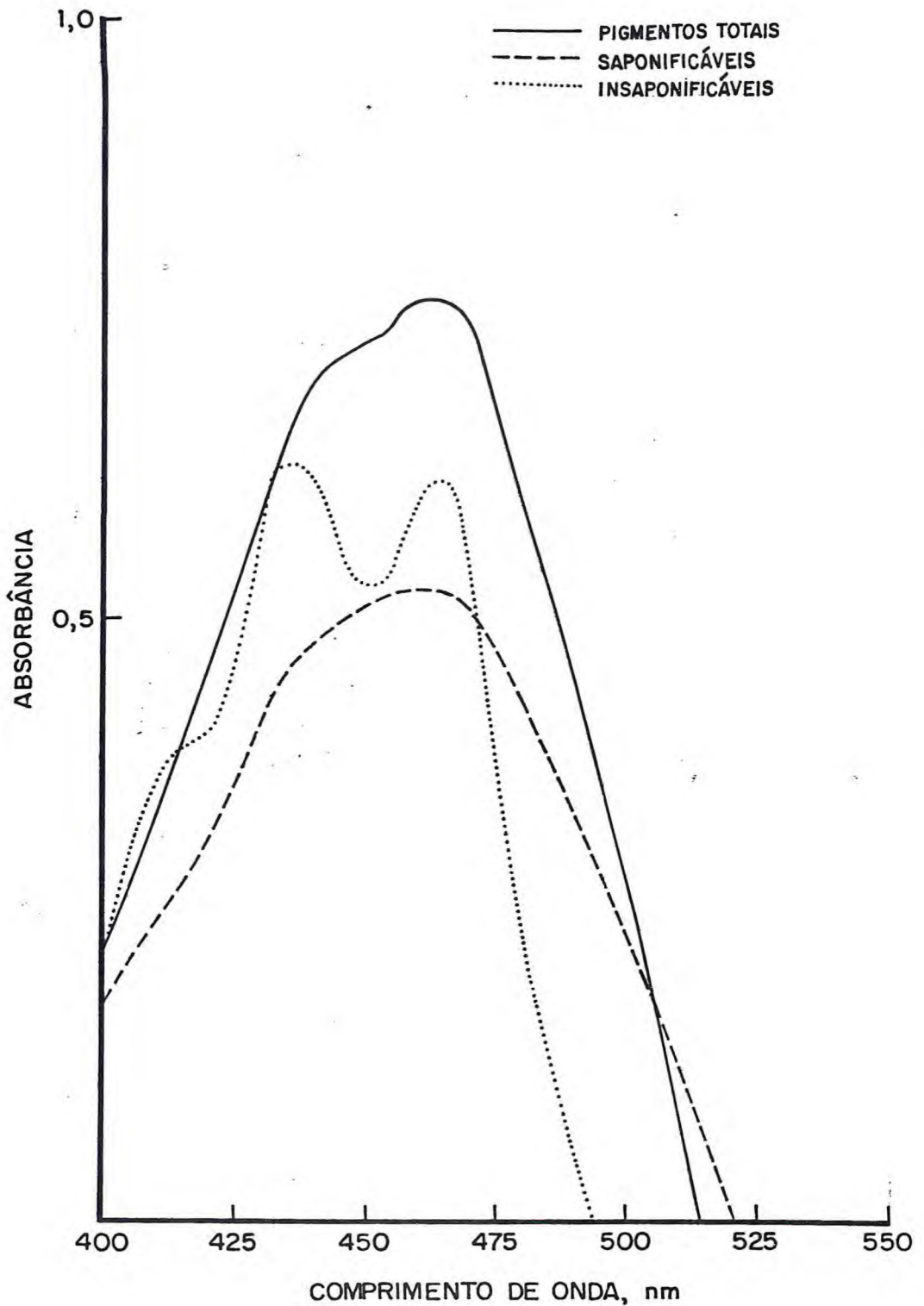


Figura 14 - Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides da pele do pargo em éter de petróleo.

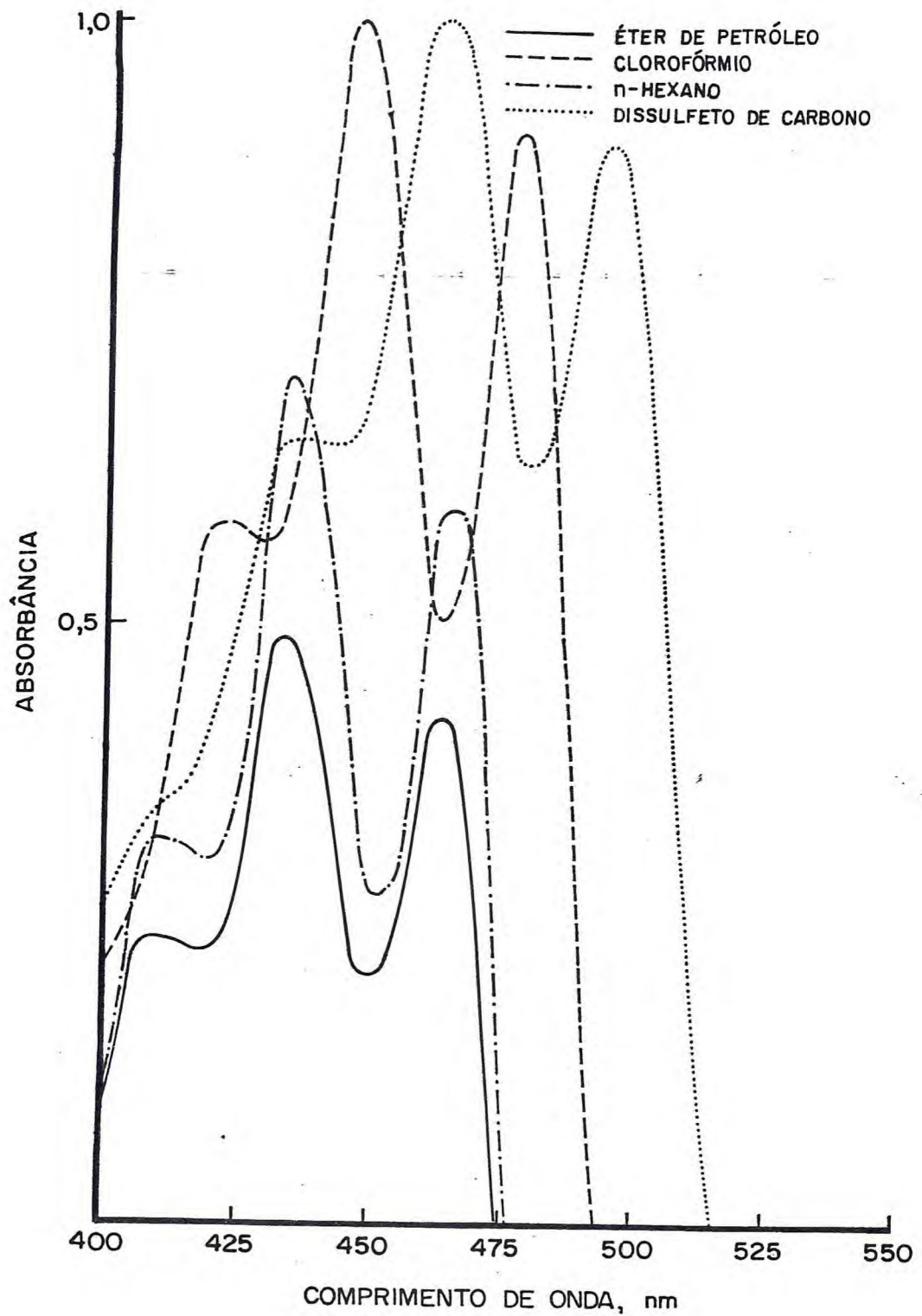


Figura 15 - Curvas espectrofotométricas da primeira fração obtida na cromatografia em coluna dos pigmentos carotenóides totais da pele do pargo em diferentes solventes.

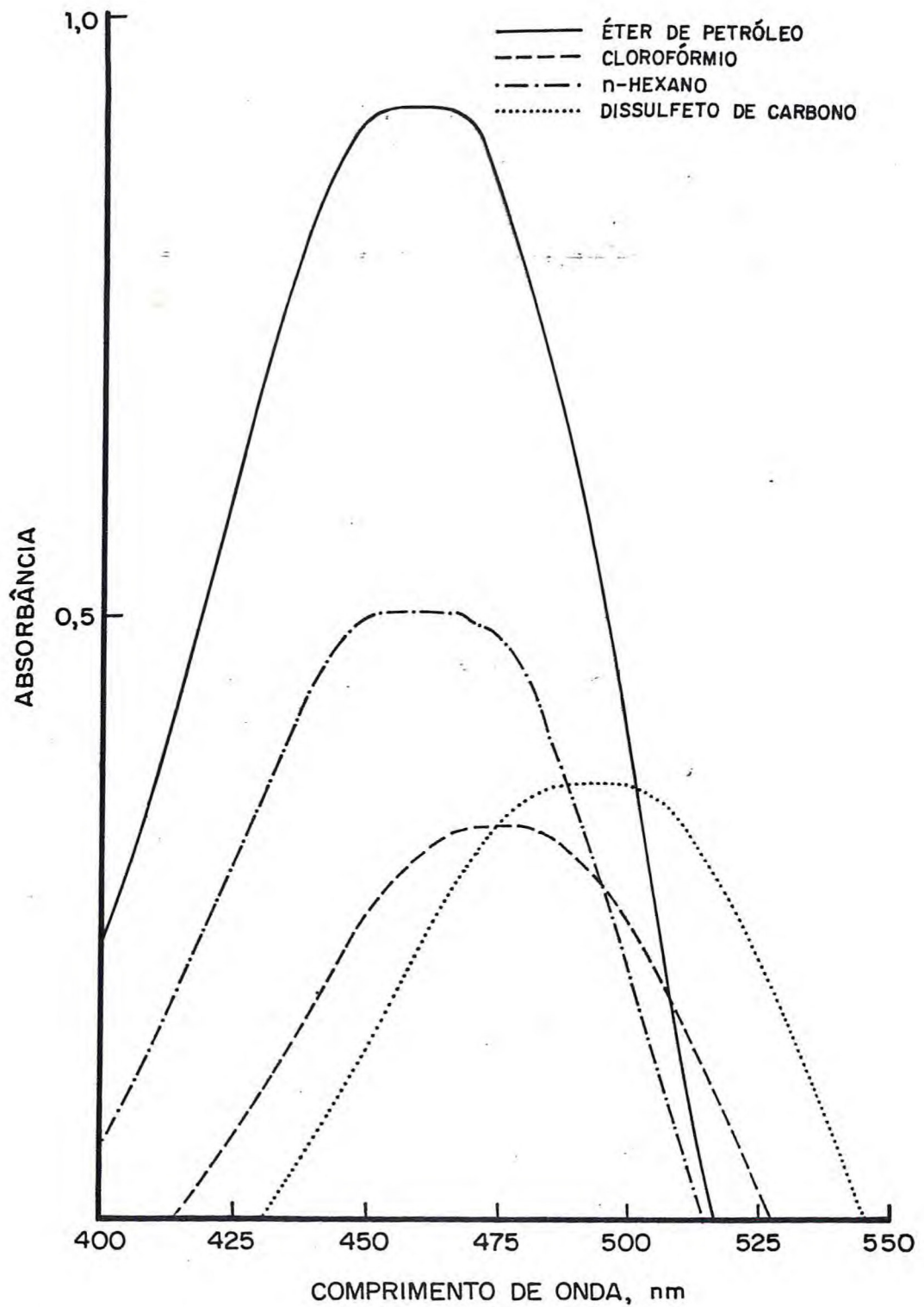


Figura 16 - Curvas de absorção espectrofotométrica da segunda fração obtida da cromatografia de coluna dos pigmentos carotenóides totais da pele do pargo em diferentes solventes.

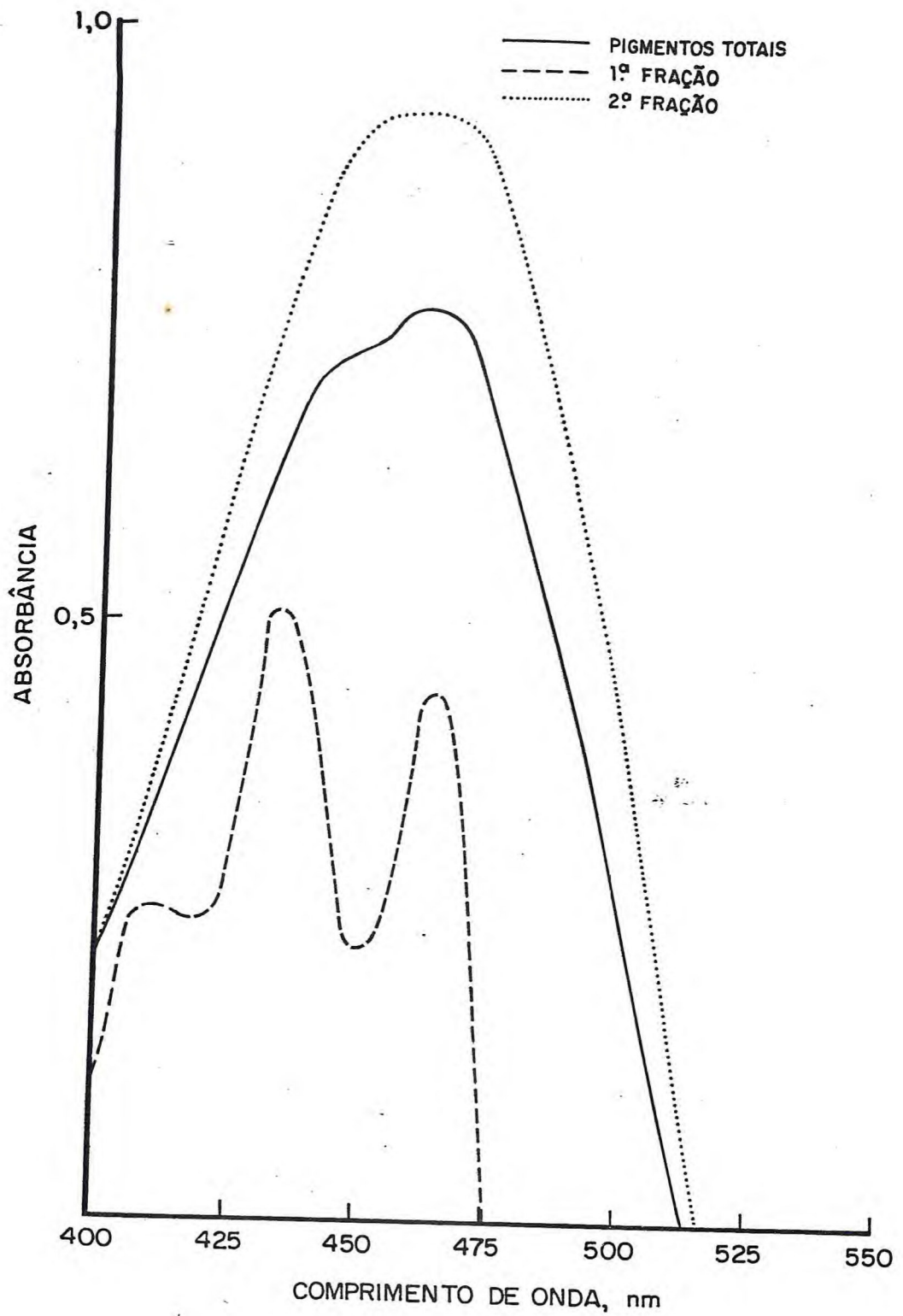


Figura 17 - Curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos carotenóides totais e das suas frações separados por cromatografia de coluna (1a. e 2a. frações em éter de petróleo).

se a curva de absorção para estes pigmentos em éter de petróleo, observamos deslocamento de comprimentos de onda de absorção máxima de 2nm em n-hexano, 13nm em cloroformio e 33nm em dissulfeto de carbono em direção à região do infravermelho. Estes deslocamentos são provavelmente ocasionados pela interação destes grupos cromóforos, com os solventes de diferentes polaridades e constantes dielétrica, DYER (1969). Esse efeito do solvente é facilmente visualizado pela coloração diferente das soluções destes pigmentos, quando se encontram dissolvidos na mesma concentração em solventes diferentes.

As curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos insaponificáveis obtidos por partição em diferentes solventes são mostrados na figura 12. Este material em éter de petróleo apresentou valores de absorção máxima de 465, 435 e 412nm. Estes resultados coincidem com os de OGAWA *et alii* (1973), para os pigmentos insaponificáveis, isolados da pele do mesmo peixe. TSUKUDA e AMANO (1966 a), estudando o comportamento das curvas de absorção, espectrofotométrica dos pigmentos insaponificáveis da pele de peixes vermelhos japoneses, no mesmo solvente, encontraram que estas curvas assemelham-se àquelas dos pigmentos totais com picos de absorção aproximadamente de 472 e 442nm.

Pelo descrito, podemos observar que o comportamento das curvas de absorção dos pigmentos insaponificáveis, encontrada por TSUKUDA e AMANO (1966 a) para peixes japoneses, diferem daquelas encontradas neste estudo para o pargo. Estes valores no entanto, coincidem plenamente com aqueles reportados pelos mesmos autores, para o carotenóide tunaxantina purificada.

As curvas de absorção espectrofotométrica dos pigmentos saponificáveis do pargo, em diferentes solventes, são apresentados na figura 13.

Em éter de petróleo, estes pigmentos obtidos por partição, apresentaram um pico de absorção máxima a 465nm e uma pequena deformação da curva aproximadamente a 443nm, as

semelhando-se deste modo, com a curva de absorção obtida para os pigmentos totais. Figura 11. Este achado poderia ser justificado pelo fato de que parte dos pigmentos insaponificáveis encontra-se, como contaminante desta fração de pigmentos saponificáveis, como poderá ser observado posteriormente neste trabalho.

Os valores do comprimento de onda de absorção máxima dos pigmentos carotenóides da pele do pargo em diferentes solventes, em nanômetros, são apresentados na tabela 1.

4.2 - Espectrofotometria dos Carotenóides Separados por Cromatografia

As curvas de absorção dos pigmentos amarelos (primeira fração), obtidos pela cromatografia em coluna dos pigmentos totais, em vários solventes, são apresentados na figura 15.

Em éter de petróleo, esta fração revelou três picos de absorção máxima a 465, 435 e 412nm. O comportamento espectrofotométrico desta curva é semelhante àquele encontrado para os pigmentos insaponificáveis, obtidos por partição, figura 12. Entretanto, estes picos de absorção apresentam-se melhor definidos nesta fração, que naquela obtida por partição. Estes valores de absorção encontrados neste estudo, estão próximos aos achados por TSUKUDA e AMANO (1966 a), quando estudaram o comportamento espectrofotométrico da fração amarela obtida da cromatografia em coluna dos pigmentos totais da pele de peixes vermelhos japoneses e que foi assumida por eles serem idênticos àqueles da tunaxantina.

As curvas de absorção dos pigmentos vermelhos (segunda fração), obtidos pela cromatografia em coluna dos pigmentos totais em diferentes solventes, estão apresentados na figura 16.

A curva de absorção desta fração em éter de petróleo apresentou um único pico de absorção máxima a 465nm. Este

Tabela 1 - Comprimento de Onda de absorção máxima dos pigmentos carotenóides da pele do pargo, em nanômetros, obtidos neste estudo e para a tunaxantina (pigmentos amarelos) e astaxantina (pigmentos vermelhos) citado por TSUKUDA (1974).

<u>Fração de Pigmentos</u>	<u>SOLVENTES</u>			
	<u>ETER DE PETRÓLEO</u>	<u>CLOROFÓRMIO</u>	<u>n-HEXANO</u>	<u>DISSULFETO DE CARBONO</u>
TOTAIS	465,443*	478,455*	467,444*	498,470*
saponificáveis (vermelhos)	465	478	467	498
Astaxantina	468	-	471	506
insaponificáveis (amarelos)	465,435,412	478,448,424	467,438,414*	497,467,440*
Tunaxantina	465,435,413	478,449,425	468,437,414*	498,467,440*

* Picos não bem definidos

valor é semelhante aquele encontrado por TSUKUDA e AMANO (1966 a), para uma fração vermelha obtida da cromatografia em coluna da pele de peixes vermelhos japoneses e que foi assumida por ele ser o pigmento carotenóide astaxantina.

A cromatografia em coluna dos pigmentos insaponificáveis, revelou um único componente amarelo que apresentou três picos de absorção a 465, 435 e 412nm. Estes valores de absorção foram idênticos aos encontrados para os pigmentos insaponificáveis, obtidos por partição e para a primeira fração da cromatografia em coluna dos pigmentos totais em éter de petróleo, porém estes picos foram melhor definidos que aqueles. Os valores de absorção encontrados para este pigmento, estão próximos aos encontrados por TSUKUDA e AMANO (1966 a), quando cromatografaram em coluna os pigmentos insaponificáveis da pele de peixes vermelhos japoneses.

A cromatografia em coluna dos pigmentos saponificáveis, apresentou, primeiramente, o desenvolvimento de uma fração com coloração amarelo citrino. Este material revelou, em éter de petróleo, três picos com absorção máxima a 465, 435 e 412nm. Uma segunda fração de cor vermelha, apresentou um único pico com absorção a 465nm. As absorções máximas encontradas na fração amarela, são idênticas aquelas observadas para os pigmentos amarelos descritos anteriormente. O aparecimento constante destes três picos de absorção parece confirmar a presença deste pigmento amarelo descrito na literatura como tunaxantina.

A presença da fração amarela nos pigmentos saponificáveis, pode dever-se a uma separação incompleta das fases epifásicas (pigmentos amarelos) e hipofásica (pigmentos vermelhos) durante o processo de partição; PETRACEK & ZECHMEISTER, (1956).

A absorção máxima encontrada para a fração vermelha neste pigmento é idêntica àquelas observadas para os pigmentos saponificáveis, antes da cromatografia em coluna, porém nesta fração não apareceu aquela deformação do pico a 443nm, isto, talvez, devido a esta fração já não estar contaminada

com os pigmentos amarelos. No entanto, esta absorção é idêntica àquela da segunda fração dos pigmentos totais. O aparecimento constante deste pico de absorção de 465nm, em éter de petróleo, confirma a presença deste pigmento vermelho neste peixe tratando-se possivelmente da astaxantina, TSUKUDA & AMANO (1966 a).

Os valores de absorção máxima obtido para os pigmentos saponificáveis (vermelhos) neste estudo são similares àqueles reportados por TSUKUDA (1974), para a astaxantina em diferentes espécies de peixes japoneses vermelhos, e aos valores de absorção máxima para astaxantina cristalizada observada por COOPER *et alii* (1975), em n-hexano, cloroformio e dissulfeto de carbono. GOODWIN e SRISUKH (1949), também reportaram estes valores de absorção máxima para a astaxantina de 470nm em n-hexano, e de 440nm em éter de petróleo e de aproximadamente 506nm em dissulfeto de carbono. Para a astaxantina esterificada, esses mesmos autores acharam valores quase idênticos aos encontrados neste estudo.

Os valores de absorção máxima obtidos para os pigmentos amarelos do pargo, coincidem com aqueles reportados por TSUKUDA e AMANO (1966 a), para o carotenóide tunaxantina em peixes vermelhos japoneses e por TSUKUDA (1974), para tunaxantina em peixes japoneses em diferentes solventes.

Os resultados (Rf) da cromatografia em placa fina de silicagel são mostrados na tabela 2. Estes resultados mostram que os pigmentos totais da pele do pargo, estão constituídos basicamente por dois tipos de materiais: um deles com Rf de 0,96 de cor amarela e outro de Rf 0,88 de coloração vermelha. Eles também indicam que os pigmentos saponificáveis obtidos do processo de partição, com solventes, encontram-se contaminados com os pigmentos amarelos, porém não acontecendo a contaminação inversa nos pigmentos insaponificáveis. A mancha vermelha com Rf 0,29 da cromatografia dos pigmentos totais e saponificáveis obtida por partição, poderia ser ocasionado por algum produto de decomposição da astaxantina no material de suporte usado neste tipo de cromatografia. Segundo TANAKA *et alii* (1981), os ésteres de asta

Tabela 2 - Valores de R_fs dos pigmentos carotenóides da pele do pargo obtidos por cromatografia em camada fina, usando-se como agente revelador uma mistura de éter de petróleo - éter etílico (3+2)

Pigmentos Totais	Pigmentos Saponificáveis		Pigmentos Insaponificáveis	
	<u>Partição</u>	<u>Cromatografia</u>	<u>Partição</u>	<u>Cromatografia</u>
0,96(a)	0,96(a)	0,88(v)	0,96(a)	0,96(a)
0,88(v)	0,89(v)	-	-	-
0,29(v)	0,29(v)	-	-	-

a = mancha amarela

v = mancha vermelha

Tabela 3 - Conteúdo de pigmentos carotenóides na pele do pargo (mg/100g de pele) em éter de petróleo.

<u>Tipo de Separação</u>	<u>Pigmentos Totais</u>	<u>Pigmentos Saponificáveis Calculados</u>	<u>Estimados*</u>	<u>Pigmentos Insaponificáveis</u>
Partição	8,15	7,50	7,91*	0,24
Cromatografia	6,71	5,63	-	1,08

*Calculados pela diferença entre totais e insaponificáveis

xantina são decompostos e convertidos a outros compostos, dependendo do tempo de contato com a silicagel, durante a cromatografia de coluna.

4.3 - Quantificação dos Pigmentos Carotenóides

A tabela 3 apresenta o conteúdo de pigmentos carotenóides totais, saponificáveis (vermelhos) e insaponificáveis (amarelos) da pele do pargo. Os valores encontrados indicam que esses pigmentos totalizam 8,1mg/100g de pele, sendo que os pigmentos saponificáveis representam aproximadamente 97,1% e os insaponificáveis 2,9%. Foi observado também que houve uma pequena diferença no conteúdo de pigmentos saponificáveis, calculados (pela fórmula de TSUKUDA, 1974, e estimados pela diferença entre os totais e insaponificáveis). Isto poderia ser devido ao fato de usar-se o coeficiente de extinção de 2400 (próprio da astaxantina) para quantificar os pigmentos totais, constituídos majoritariamente dos pigmentos vermelhos, supostamente astaxantina e de uma fração minoritária de pigmentos amarelos, semelhante a tunaxantina.

Quando os pigmentos totais foram separados por cromatografia em coluna, a quantidade de pigmentos insaponificáveis (amarelos) aumentou e a dos saponificáveis (vermelhos) diminuiu, indicando novamente, como foi mencionado nos estudos espectrofotométrico e cromatográfico, que a fase saponificável, obtida por partição, apresenta-se apreciavelmente contaminada pelos pigmentos amarelos.

Por outro lado, comparou-se o conteúdo de pigmentos de dois pargos, um com a pele bastante pigmentada de vermelho e outro apresentando visíveis sinais de perda de cor, como é mostrado na figura 9.

A tabela 4 mostra os resultados deste estudo.

Os valores indicam que não houve variações qualitativas na composição dos pigmentos carotenóides na pele do pargo vermelho, quando comparada àquela do pargo descorado. No

Tabela 4 - Valores de absorção máxima (nm) e concentração de pigmentos carotenóides (mg/100g de pele) para os peixes analisados. Diferentes condições.

<u>Totais de Peixes</u>	<u>Absorção máxima em Eter de Petróleo (nm)</u>			<u>Concentração (mg/100g)</u>		
	<u>Totais</u>	<u>Saponificáveis</u>	<u>Insaponificáveis</u>	<u>Totais</u>	<u>Saponificáveis</u>	<u>Insaponificáveis</u>
Pargo Vermelho	465	465	465, 435, 412	8,15	7,91	0,24
Pargo Descolorido	465	465	465, 435, 412	4,64	4,40	0,24

estudo quantitativo destes pigmentos, porém, houve uma evidente redução dos pigmentos totais no peixe descolorado, sendo que esta redução acontece quase que exclusivamente por perda dos pigmentos vermelhos majoritários identificados neste estudo com um carotenóide semelhante à astaxantina.

É importante salientar que, durante a cromatografia em coluna feita nos pigmentos totais e saponificáveis do peixe descolorido, acumulou-se uma substância com coloração rosada no topo da mesma que não foi eluída, tratando-se provavelmente do carotenóide astaceno, formado por oxidação da astaxantina mas que não foi possível ser identificado.

As causas da perda de cor dos peixes vermelhos tem sido discutidas por TSUKUDA (1974), que associa à presença de numerosas ligações duplas conjugadas nas moléculas destes pigmentos e aos fatores tais como; ar, luz ultravioleta e ions metálicos, bem como o traumatismo recebido por alguns peixes durante o processo de captura. HATA & HATA (1971 b) observou que os peixes vermelhos japoneses mudam de cor durante algum estágio de crescimento. TSUKUDA (1970) observou que a mudança de cor em peixes vermelhos da baía de Tóquio é causada pelas oxidações química e enzimática.

Agentes antioxidantes, tais como butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT), têm sido usados para retardar a ação oxidativa dos ácidos graxos, prevenindo deste modo a mudança de cor dos pigmentos carotenóides causados por agentes oxidantes TSUKUDA (1970).

OGAWA et alii (1973) observaram que o uso de antioxidantes, seguido do congelamento, determina a manutenção de uma melhor coloração no pargo.

Acreditamos que, através do esclarecimento básico dos pigmentos existentes neste peixe, outros estudos sejam feitos com a finalidade de serem encontradas as principais causas da perda de cor nesses peixes, resolvendo este grande problema para a indústria local.

5 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que:

- a) A cor vermelha da pele do pargo é decorrente da presença de dois pigmentos carotenóides majoritários, sendo um destes pigmentos vermelho e outro amarelo;
- b) A concentração total destes pigmentos é de aproximadamente 8,0mg/100 de pele, sendo que os pigmentos vermelhos representam 97% e os amarelos 3% deste total;
- c) O estudo espectrofotométrico destes pigmentos em éter de petróleo apresentou 3 picos de absorção máxima a 465, 435 e 412nm, para pigmentos amarelos e um pico único a 465 nm para os pigmentos vermelhos;
- d) O comportamento espectrofotométrico dos pigmentos carotenóides amarelos e vermelhos são compatíveis com aqueles dos carotenóides tunaxantina e astaxantina respectivamente;
- e) O estudo cromatográfico indicam que a separação dos pigmentos amarelos por partição com solvente não foi eficiente, apresentando a fase hipofásica ou metanólica (pigmentos vermelhos) contaminados de pigmentos epifásicos (amarelos);
- f) A separação dos pigmentos amarelos e vermelhos por cromatografia de coluna usando-se óxido de magnésio como adsorvente mostrou-se uma técnica eficiente para efeitos de quantificação destes pigmentos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, H. & MEYER, S.P. Effect of antioxidants on stability of astaxanthin pigment in crawfish waste and oil extract. J. Food Sci., 30: 469-73, 1982 a.
- & —————. Extration of astaxanthin pigment from crawfish waste a soy oil process. J. Food Sci., 47: 892-900, 1982 b.
- CLYDESDALE, F. M. & FRANCIS, F. J. Carotenoids. In: FENNEMA, O. R. Principles of Food Science. Part I. Food Chemistry. New York, Ed. Marcel Dekker, Cap. 9, 1976.
- CEPA, Comissão Estadual de Planejamento Agrícola. Comportamento conjuntural do setor agropecuário do Estado do Ceará - 1982. Fortaleza, Secretaria de Planejamento e Coordenação, 1983 p. 203.
- COOPER, R. D. G. ; DAVIS, J. B.; LEFTWICK, A. P.; PRICE, C.; WEEDON, B. C. L. Carotenoids and related compounds. Part XXXII. Synthesis of astaxanthin, phoenicoxanthin, hydroxye chinonone, and the corresponding diosphenols. J. Chem. Soc. 21: 2195-2204, 1975.
- DYER, J. R. Aplicação de espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 1969 p. 155.
- EMODI, A. Carotenoids; properties and applications. Food Technol 32(5): 38-42, 1978.
- EMODI, A.; SCIALPI, L.; ANTOSHKIN, T. Carotenoid colors; water-dispersible, optically-clear. Food Technol, 30(7): 58-60, 1976.
- EVELYN, T. P. T. Pigments from a Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) with unusual skin colouration. J. Fish. Res. Brd. Canada, 24(10): 2195-9, 1967.

- FONTAINE, A. R. The colours of *Ophiocoma nigra* (Abildgaard); carotenoid pigments. Journ. Mar. Biol. Assoc. U. K. 42: 33-47, 1962.
- GOODWIN, T. W. Carotenoids, their comparative biochemistry. New York, Chemical Publishing, 1954. 355 p.
- GOODWIN, T. W. & SRISUKH, S. Some observations on astaxanthin distribution in marine crustacea. J. Biochem., 45:268-70, 1949.
- HATA, M. & HATA, M. Carotenoid pigments in goldfish (*Carrasius auratus*); composition and distribution of carotenoids. Int. J. Biochem., 2:11-9, 1971 a.
- & —————. Carotenoid pigments in goldfish (*Carrasius auratus*); colour change and carotenoid pigment composition. Int. J. Biochem., 2:182-4, 1971 b.
- & —————. Carotenoid pigments in goldfish; conversion of zeaxanthin to astaxanthin. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 38(4): 339-43, 1972.
- HATA, M. Carotenoid discolorations in fishery products. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 33(9):889-93, 1967.
- HIRAO, S. Carotenoids in fishes. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 33(9):866-71, 1967.
- ; KIKUCHI, R.; TAGUCHI, H. Carotenoid pigments in fish. Carotenoids in goldfish and fancy colored Carp. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 29(4): 371-81, 1963 a.
- ; OZAWA, S.; SUEMATSU, Y. Carotenoid pigments in fish. Effect of dietary carotenoid on body color of goldfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 29(4): 382-6, 1963 b.
- ; KIKUCHI, R. HAMA, T. The carotenoids of the Medaka *Oryzias latipes* a teleost. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 35(2): 187-98, 1969.
- IKAN, R. Isoprenoids. In: Natural products A. Laboratory Guide. New York, Academic Press, 1976. 301 p., cap. 3.

- KANEMITSU, T. & AOE, H. On studies of carotenoids of the Salmon; indentification of the muscle pigments. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 24(3): 209-15, 1958 a.
- & ————. On the studies of carotenoids of the Salmon; determination of muscle pigment. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 24(6/7): 555-8, 1958 b.
- KATAYAMA, T.; YOKOYAMA; CHICHESTER, C. O. The of biosynthesis of astaxanthin; the structure of alfa-doradexanthin and be ta-doradexanthin. Int. J. Biochem., 1:444-448, 1970.
- KIBIYA, T. Morfological and physiological aspects on fishery pigments. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 33(9): 872-77, 1967.
- LAGLER, K. F.; BARDACH, G. E.; MILLER, R. R. Ichthyology. New York, Ed John Willy, 1962, Cap. 4.
- LEE, K. & KIM, C. Pigments in marine fish and shell-fish; ca rotenoids in sea mussel, Mytilus edulis. Bull. Pusan Fish. Coll., 11(1): 57:62, 1971.
- MATSUNO, T.; KUSUMOTO, T.; WATANABE, T.; ISHIHARA, Y. Carote noid pigments of spiny lobster. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 30(1): 43-50, 1973 a.
- ; AKITA, T.; HARA, M. Carotenoid of Japanese an chovy. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 39(1): 51-4, 1973 b.
- ; MATSUTAKA, H.; NAGATA, S. Metabolism of lutein and zeaxanthin to ketocarotenoids in goldfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47(5): 605-11, 1981.
- ; ————— ; —————. Carotenoids of four species of crucian carp and two varieties of goldfish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47(1): 85-8, 1981.
- & OOKUBO, M. Carotenoids of halfbeak Especialy of red-colored integuments of mandible. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47(6) : 613-4, 1981.
- MORAIS, C.; TEXEIRA, C. G.; LEITÃO, M. F. F.; MLYA, E. E. In fluência dos carotenoides na pigmentação de camarões conge lados. Col. Inst. Tecnol. Alim., 6:121-9, 1975.

- OGAWA, M.; MAIA, E. L.; NORONHA, M. C. C.; BEZERRA, F. J. *Preservação da qualidade e da coloração do Pargo. Lutjanus purpureus*, Poey. Arq. Ciên. Mar., Fortaleza, 13(1):45-9, 1973.
- PETRACEK, F. J. & ZEACHMEISTER, L. Determination of partition coefficients of carotenoids as a tool in pigments analysis. Anal. Chem., 28:1458-85, 1956.
- TANAKA, Y.; KATAYAMA, T.; SIMPSON; CHICHESTER, C. O. Stability of carotenoids on silicagel and other adsorbents. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47(6):799-811, 1981.
- TEIXEIRA NETO, R. O.; KAREL, M.; SAGUY, I.; MIZRAHI. Oxygen uptake and beta carotene discoloration in a dehydrated food model. J. Food Sci., 46:665-9, 1981.
- TSUKUDA, N. Studies on the pigments of a deep sea prawn (*Pandalus borealis*, Krøyer) identification and concentration of pigments. Bull. Japan. Soc. Sci., (11): 109-15, 1963.
- . Studies in the discoloration of red fishes; effect of chemicals on enzymatic discoloration. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 36(8): 806-11, 1970.
- . Isolation and estimation of carotenoid pigments. In: SAITOH, T.; ed. Saisanseibutsu Shokuhingkkensho Tokyo, Koseisha-Koseikeku, Cap. 9, 1974.
- . Abnormal coloration of flesh of Sea Bass in Tokyo Bay and its pigments. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab. (102): 85-92, 1980.
- . & AMANO, K. Studies on discoloration of red fishes: content of carotenoid pigments in eighteen species of red fishes. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 32(4): 334-45, 1966 a.
- & ———. Studies on the discoloration of red fishes; the discoloration of three species during ice and freeze storage. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 32(6):522-9, 1966 b.
- & ———. Studies on the discoloration of red fishes; the effect of sunlight on the discoloration of the carotenoid pigments of fish skins. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., (48): 37-46, 1966 c.

WILLSTAETTER, R. Carotenoids. In: BRAVERMAN, J. B. S. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Barcelona, Omega, 355 p. 1967. Cap. 3.