



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



**Dissertação de Mestrado**

**ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE EM CAMARÃO (*Litopenaeus*  
*vannamei*) SUBMETIDO AO EMPREGO DO FRIO E ATMOSFERA  
MODIFICADA**

**LUCIVÂNIA ASSIS DE OLIVEIRA**

**JOÃO PESSOA**

**FEVEREIRO/2013**

**LUCIVÂNIA ASSIS DE OLIVEIRA**

**ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE EM CAMARÃO (*Litopenaeus  
vannamei*) SUBMETIDO AO EMPREGO DO FRIO E ATMOSFERA  
MODIFICADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**Orientador:** Prof. Dr. José Marcelino Oliveira Cavalcheiro

**JOÃO PESSOA**

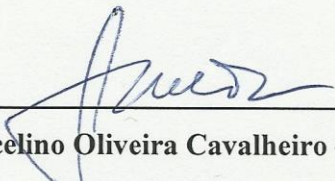
**FEVEREIRO/2013**

**LUCIVÂNIA ASSIS DE OLIVEIRA**

**ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE EM CAMARÃO (*Litopenaeus  
vannamei*) SUBMETIDO AO EMPREGO DO FRIO E ATMOSFERA  
MODIFICADA**

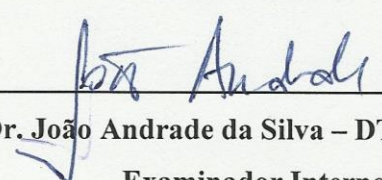
Dissertação: Aprovada em 26/02/2013

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. José Marcelino Oliveira Cavalcheiro – DTA/CTDR/UFPB**  
**Orientador/Presidente**



---

**Prof. Dr. João Andrade da Silva – DTA/CTDR/UFPB**  
**Examinador Interno**

---

**Profa. Dra. Anamélia Sales de Assis – UFRPE**  
**Examinador Externo**

**JOÃO PESSOA**

**FEVEREIRO/2013**

*Aos meus pais, Nivaldo Ricardo e Maria de Lourdes,*

*Por todo amor, dedicação e incentivo.*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, razão maior da nossa existência. Sem Ele nada disso seria possível. Obrigada meu Deus por mais uma etapa vencida na minha vida. A Te toda honra e toda glória.

Ao meu pai, Nivaldo Ricardo, minha mãe, Maria de Lourdes, por todo amor, carinho, apoio e confiança sempre. Obrigada meus queridos pais pela oportunidade de ser quem eu sou hoje, graças aos seus esforços eu cheguei até aqui.

Aos meus irmãos Lucivaldo, Lucenilson e Nivailson pelo apoio, amizade e por acreditarem em mim.

Aos meus lindos sobrinhos Nathalia, João Gabriel e Maria Cecília. Titia ama vocês.

Ao meu namorado Renato Navarro (Rezinho), pelo amor, carinho, companheirismo, incentivo e paciência. Por está sempre ao meu lado nos momentos bons e difíceis. Obrigado por tudo meu amor.

A meu orientador Prof. Dr. José Marcelino Oliveira Cavalheiro, pela oportunidade, confiança e ensinamentos, meu sincero agradecimento.

A coordenadora desse projeto Margareth Rocha pela confiança e oportunidade de desenvolver o projeto.

Ao Prof. Dr. Heinz Johann Holschuh pelo conhecimento, ensinamento e disponibilidade em me auxiliar na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Andrade da Silva por aceitar a participar das bancas de qualificação e defesa e pelas relevantes contribuições acadêmico-científicas.

.

A Profa. Dra. Anamélia Sales de Assis por ter aceitado participar das bancas de qualificação e defesa e pelas contribuições acadêmico-científicas.

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB, pela realização do mestrado.

As bolsistas, Jussara e Kilma, por toda ajuda e dedicação nas análises laboratoriais. A Tainá Amaral pela ajuda já no final das análises, mas que foi fundamental para realização desta pesquisa. Meninas meu muito OBRIGADA!!!

À minha amiga, Jaci pela amizade, preocupação, incentivo, carinho. Amiga de todas as horas.

As amigas de Pós-Graduação, em especial, Lô- Ruama, Dayana, Vanessa, Isabelle, Angela, Inês, Luciana, Gerciane, Janaina, Poliana pelo apoio, amizade e companheirismo.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica dos Alimentos (LBA), Gilvandro, Alinne e Lucas pelo apoio e amizade.

A equipe do Laboratório de Análises Químicas de Alimentos (LAQA), Narciza, June e Taliana pela colaboração na execução das análises.

A todos do Laboratório de Operações Unitárias (LOU), pelo apoio em especial Rafael Peixoto e Chico pela disponibilidade durante a etapa de congelamento das amostras.

Ao Laboratório Multi-usuário de Caracterização e Análise – Central Analítica da UFPB (LMCA), em especial a Marcelo Cavalcante, pela obtenção do Nitrogênio Líquido.

A Cândido por toda ajuda e paciência na realização da análise de sulfito.

A Diego Valois, por contribuir com as análises estatística. Obrigada!

A Escola Agrícola de Jundiaí (EJA – UFRN), em especial Professor Eronilson pelo apoio e compreensão.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e a Rede de Pesquisa de Carcinicultura Nacional (RECARCINA), pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, pelas bolsas concedidas.

*“Sem sonhos, a vida não tem brilho.  
Sem metas, os sonhos não têm alicerces.  
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.  
Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos.  
Melhor é errar por tentar do que errar por omitir!”*

*Augusto Cury*



## RESUMO

OLIVEIRA, L. A. 2013. **Atividade da polifenoloxidase do camarão (*Litopenaeus vannamei*) submetido ao emprego do frio e atmosfera modificada**. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Após a despesca o camarão é muito perecível, com vida de prateleira limitada, devido à melanose e contaminação microbiológica. A melanose é desencadeada por um mecanismo bioquímico que oxida fenóis a quinonas pela enzima polifenoloxidase (PPO). As quinonas por sua vez, reagem não enzimaticamente com outros compostos formando melaninas pigmentos escuros, responsável pela melanose. Apesar de não causar danos à saúde do consumidor, a melanose reduz drasticamente o valor comercial do camarão. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática da PPO do camarão *Litopenaeus vannamei* submetido ao congelamento, atmosfera modificada e ao resfriamento em gelo durante seus respectivos armazenamentos. As amostras foram obtidas em ambiente de comercialização, acondicionadas e transportadas ao Laboratório de Tecnologia e Processamento de Carnes e Pescado (LTPCP/DEA/UFPB). Os produtos foram elaborados a partir de camarões inteiros e posteriormente, submetidos aos seguintes tratamentos: freezer doméstico à  $(-18 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – FREEZER; túnel de congelamento a  $(-35 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – TÚNEL; nitrogênio líquido  $(-86 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – NITROGÊNIO; refrigeração em gelo – GELO; Atmosfera Modificada (75%CO<sub>2</sub> / 25% O<sub>2</sub>) – AM1; Atmosfera Modificada (25%CO<sub>2</sub> /75% O<sub>2</sub>) – AM2 e Embalagem a Vácuo – VÁCUO. As amostras congeladas foram armazenadas  $(-18 \text{ }^{\circ}\text{C})$  por 90 dias e as amostras refrigeradas em gelo e atmosfera modificada foram armazenadas durante 9 dias. O nitrogênio líquido e a embalagem a vácuo mostraram-se mais eficácia na inibição da atividade da PPO e no retardamento da melanose durante o período de armazenamento. Quanto aos parâmetros físicos houve uma redução na cor e atividade água e um aumento no pH e força de cisalhamento ao longo do tempo, tanto nas amostras congeladas como nas refrigeradas.

Palavras-chave: carcinicultura, métodos de conservação, polifenoloxidase, melanose.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, L. A. 2013. **Polyphenoloxidase activity shrimp (*Litopenaeus vannamei*) submitted to the use of modified atmosphere cold.** Dissertation (MSc in Food Science and Technology), Federal University of Paraíba, João Pessoa.

After despesca shrimp is highly perishable, with a shelf life limited due to the occurrence of melanosis and microbial contamination. The melanosis is triggered by a biochemical mechanism that oxidizes phenols to quinones by the enzyme polyphenol oxidase (PPO). Quinones in turn react non-enzymatically with other compounds forming dark melanin pigments responsible for melanosis. Although not damaging to consumer health, melanosis dramatically reduces the commercial value of the shrimp. The aim of this study was to evaluate the enzymatic activity of PPO shrimp *Litopenaeus vannamei* subjected to freezing, modified atmosphere and cooling in ice for their respective stores. Samples were obtained in trading environment, packed and transported to the Laboratory of Technology and Processing Meat and Fish (LTPCP / DEA / UFPB). The products were made from whole shrimp and subsequently submitted to the following treatments: the domestic freezer ( $-18 \pm 1$  ° C) - FREEZER; tunnel freezing at ( $-35$  ° C) - TUNNEL, liquid nitrogen ( $-86$  ° C) - NITROGEN; cooling on ice - ICE; Modified Atmosphere (75% CO<sub>2</sub> / 25% O<sub>2</sub>) - AM1, Modified Atmosphere (25% CO<sub>2</sub> / 75% O<sub>2</sub>) - AM2 and Vacuum Packaging - VOID. The samples were stored subjected to freezing ( $-18$  ° C) for 90 days, and the samples cooled on ice and modified atmosphere were stored for 9 days. The vacuum packaging liquid nitrogen and were more effective in inhibiting PPO activity, and delayed melanosis during storage. The color parameters pH, shear force and water activity have changed over time, both in frozen samples as in chilled.

**Keywords:** shrimp farming, conservation methods, polyphenoloxidase, melanosis, freezing, modified atmosphere, cooling.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Evolução da produção mundial de pescado, 1950-2008. ....	17
Figura 2	Estágios de melanose em camarão da espécie <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	31

### ARTIGO 1

Figura 1	Escores de estágio de melanose em camarões congelados sob diferentes métodos e armazenados ( $-18 \pm 1$ °C) por um período de 90 dias. ....	46
Figura 2	Fotografia de camarão congelado sob diferentes métodos de congelamento e armazenado a ( $-18 \pm 1$ °C) por de 90 dias. ....	47
Figura 3	Avaliação dos valores de $L^*$ do camarão congelado sob diferentes métodos e armazenados a $-18 \pm 1$ °C por 90 dias. ....	49

### ARTIGO 2

Figura 1	Escores de estágio de melanose em camarão armazenando em diferentes atmosferas e em gelo escama por um período de 9 dias. ....	68
Figura 2	Fotografia do camarão refrigerado sob diferentes atmosferas e em contato em gelo escama por um período de 9 dias. ....	69
Figura 3	Avaliação dos valores de $L^*$ do camarão refrigerado sob diferentes atmosferas e em contato em gelo escama por um período de 9 dias. ....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escala e descrição do desenvolvimento de melanose em camarão.....	20
----------	---	----

### ARTIGO 1

Tabela 1	Atividade enzimática (U), teor de proteína ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e atividade específica (AE) da PPO do camarão congelado sob diferentes métodos e armazenado ( $-18 \pm 1$ °C) por 90 dias.....	44
Tabela 2	Parâmetros físicos do camarão congelado sob diferentes métodos e armazenado ( $-18 \pm 1$ °C) durante 90 dias.....	50

### ARTIGO 2

Tabela 1	Médias e desvio padrão da atividade enzimática (U), teor de proteína ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e atividade específica (AE) da PPO do camarão refrigerados sob diferentes atmosferas e em contato em gelo escama armazenados por um período de nove dias.....	67
Tabela 2	Médias e desvio padrão dos parâmetros físicos do camarão refrigerado sob diferentes atmosferas e em contato em gelo por de 9 dias.....	71

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Aa	Atividade de água
ABCC	Associação brasileira de criadores de camarão
AE	Atividade específica
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BVT	Bases voláteis totais
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
EAM	Embalagem atmosfera modificada
FAO	Food and Agriculture Organization
HdPO	Hemocianina derivada da fenoloxidase
pH	Potencial hidrogeniônico
PPO	Polifenoloxidase
U	Atividade enzimática

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Aquicultura Mundial.....	16
2.2 Carcinicultura no Brasil .....	18
2.3 Ação da polifenoloxidase em camarão .....	19
2.4 Conservação do pescado .....	22
2.5 Uso do frio na conservação do camarão .....	23
2.6 Embalagem com atmosfera modificada.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Obtenção da matéria-prima.....	28
3.2 Tratamentos .....	28
3.2.1 Congelamento.....	28
3.2.2 Atmosfera modificada .....	28
3.2.3 Resfriamento em gelo.....	29
3.3 Análises química e física .....	29
3.3.1 Atividade enzimática da polifenoloxidase .....	29
3.3.2 Determinação de proteínas.....	30
3.3.3 Análise instrumental de cor .....	30
3.3.4 Textura .....	30
3.3.5 Potencial hidrogeniônico (pH) .....	30
3.3.6 Atividade de água (Aa) .....	30
3.4 Análise visual de melanose.....	31
3.5 Análise estatística .....	32
REFERÊNCIAS .....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1 ARTIGO 1 .....	40
4.2 ARTIGO 2 .....	58
ANEXOS .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com os números divulgados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2010) no ano de 2008 mais de 52% da produção mundial de camarão foi proveniente do cultivo. A carcinicultura aumentou em média 13,18% ao ano entre 1998 a 2008, enquanto que a produção extrativa cresceu apenas 1,57% ao ano no mesmo período, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Camarão (ABCC, 2010). Dessa forma verifica-se que a produção extrativa já atingiu o seu limite de exploração sustentável, de forma que a crescente demanda mundial só poderá ser atendida pela produção advinda da atividade de cultivo.

Uma das preocupações do setor de pesqueiro é a alta perecibilidade do pescado, logo após sua captura. Essa perecibilidade é devido às reações bioquímicas e químicas de origem autolítica, que degradam componentes musculares (OGAWA; MAIA, 1999; VIERA, 2004). No caso específico do camarão, a tirosina, um aminoácido decorrente do desdobramento da proteína por ação de bactérias, pode ser oxidada na presença de oxigênio pelas enzimas polifenoloxidasas (PPO) e causar o desenvolvimento da melanose (MORAIS, 1981). Segundo Carvalho (2005) a melanose é uma reação química natural que ocorre em camarão e resulta no escurecimento da carapaça e em graus mais avançados, no músculo. O frio é um método bastante utilizado para reduzir as perdas logo após a captura, já que as baixas temperaturas são eficazes para retardar o crescimento microbiano e as atividades metabólicas *post-mortem* dos tecidos animais, além de controlar as reações químicas deteriorativas, incluindo oxidações enzimáticas e lipídicas e as alterações químicas associadas à modificação da cor. A utilização de baixas temperaturas permite preservar as características sensoriais do produto. Outro método utilizado na conservação de pescado é a embalagem com atmosfera modificada. A finalidade desse tipo de embalagem é proporcionar uma vida de prateleira maior aos produtos alimentícios e prevenir (ou pelo menos retardar) qualquer alterações indesejáveis nas características sensoriais, nutritivas e microbiológicas dos alimentos. Para Genigeorgis (1985) existem duas categorias de atmosfera modificada empregada na conservação de alimentos: modificação da atmosfera por meio da adição de misturas de gases a embalagem e vácuo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da PPO do camarão *Litopenaeus vannamei* submetido ao congelamento, resfriamento em gelo e a atmosfera modificada, durante seus respectivos armazenamentos.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 AQUICULTURA MUNDIAL

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2010), em 2008 a produção mundial de pescado foi 159,09 milhões de toneladas, sendo 90.8 milhões (57,04%) oriundos da pesca extrativa e 68.3 milhões (42,96%) da aquicultura. Nas últimas décadas a aquicultura vem sendo responsável pelo crescimento da produção do pescado, apesar da elevada representatividade da pesca extrativa. Até o final dos anos 80, a pesca extrativa chegou a representar mais de 90% da produção total. Porém, o crescimento da produção mundial, entre 1998 e 2008 foi atribuído, fundamentalmente, à aquicultura, que obteve crescimento de 179,51%, ao passo que a pesca extrativa evoluiu, apenas, 3,66% (FAO, 2010). Essa mudança na dinâmica da base produtiva contribui para o desenvolvimento sustentável da atividade. Na figura 1 esta ilustrada a evolução da produção pesqueira de 1950 a 2008.

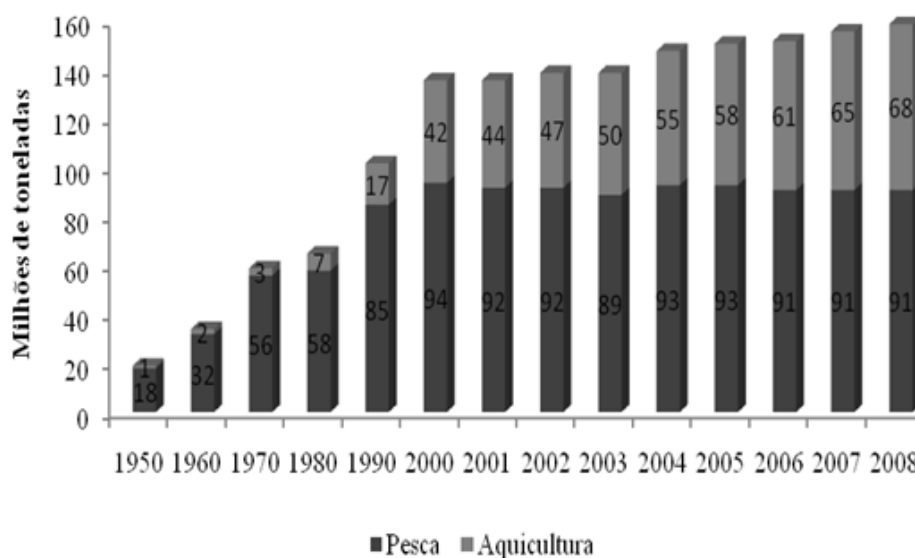


FIGURA 1 - Evolução da produção mundial de pescado, 1950-2008.

Fonte: FAO, 2010

Nos próximos anos a tendência é que a aquicultura continue mantendo seu crescimento. A procura dos consumidores por uma dieta mais saudável é um fator que contribui com esse crescimento devido à qualidade do pescado em relação a outras

fontes de proteína animal, associando o seu consumo à saúde. A aquicultura também deverá atuar como uma atividade complementar à pesca, especialmente, num contexto de redução dos estoques naturais, abrindo possibilidades para a inserção de pescadores artesanais. Adicionalmente, traz como diferencial competitivo a maior integração à agroindústria, uma vez que permite uma oferta mais regular do produto (LOPES et al, 2010).

China, Indonésia, Índia, Peru, Japão, Filipinas, Estados Unidos e Chile são os principais países produtores de pescado, em conjunto, respondem por 63,98% da produção total. A China lidera este mercado desde 1998, em 2008, produziu 57,8 milhões de toneladas. A Indonésia, apesar do segundo lugar, produz 8,8 milhões de toneladas. O Brasil produziu 1,2 milhões de toneladas ocupando o 22º lugar (FAO, 2010).

Com relação à produção mundial de camarão, a evolução entre os anos de 1998 (3.629.976 t) e 2008 (6.519.671 t), tem como destaque, a participação da carcinicultura, com um aumento de 244% nos últimos dez anos passou de uma representação de 27% (985.898 t) para 52% (3.399.105 t) (FAO, 2010).

De acordo com os números divulgados pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2010), referentes às estatísticas mundiais de pescado do ano de 2008, verifica-se que a produção extrativa de camarão já atingiu o seu limite de exploração sustentável. Portanto, com a crescente demanda mundial por esse produto, só poderá ser atendida pelo cultivo.

## 2.2 CARCINICULTURA NO BRASIL

A carcinicultura brasileira é uma atividade recente, onde as primeiras tentativas de produção de camarão ocorreram entre os anos de 1972 e 1974, tendo como base tecnologias importadas, cujas validações e aprimoramentos contribuíram para a definição de um pacote tecnológico próprio e adequado à realidade nacional. Nessa mesma década foi criado, pelo governo do Rio Grande do Norte, o “Projeto Camarão”, visando estudar a viabilidade do cultivo de camarão em salinas desativadas, já que a extração do sal enfrentava séria crise de preço e de mercado. Foi escolhida a espécie *Penaeus japonicus* para a produção, devido aos conhecimentos prévios de técnicas

relacionadas à sua reprodução e cultivo. Porém a espécie se mostrou inviável frente às condições ambientais apresentando pelo país, assim como a utilização de tecnologias inadequadas (ARAÚJO, 2003; ROCHA et al., 2004; NATORI, 2011).

Com a evolução da produção do camarão *Litopenaeus vannamei* no Equador, o Brasil começou a cultivar a espécie nos anos 90 e a atividade chegou ao atual estágio de desenvolvimento. A produção brasileira de camarão marinho vem crescendo significativamente nos últimos anos, destacando-se a Região Nordeste como principal polo produtor do país. Esta região é responsável por aproximadamente 95% da produção nacional da carcinicultura, por possuir clima quente e favorável ao cultivo durante todos os meses do ano. Em pouco tempo, o “Camarão Branco do Pacífico” ou “Camarão Cinza” como é conhecido demonstrou alta adaptabilidade às condições climáticas brasileiras, devido à rusticidade, rapidez no crescimento, ampla faixa de tolerância à salinidade e grande aceitação no mercado, transformando-se praticamente na única espécie cultivada comercialmente no país.

Entre os anos de 1997 a 2007, a produção de camarão no Brasil cresceu em ritmo acelerado atingido os 253,61%. Os avanços da tecnologia em relação à reprodução engorda, autossuficiência na produção de pós-larvas, oferta de ração de qualidade e o processamento do produto final tornaram o Brasil como destaque mundial no cultivo de camarão (OSTRENSKY NETO, 2002; ROCHA et al., 2004; POERSCH et al., 2006; FONSECA et al., 2009; NATORI, 2011).

O camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, se distribui naturalmente ao longo da costa do Pacífico da América do Sul e Central. Na década de 1990 foi introduzida no Brasil sendo, portanto a espécie mais cultivada, respondendo por mais de 95% da produção nacional demonstrando boa capacidade de adaptação as diferentes condições climáticas do Brasil, isso se deve à rusticidade, rápido crescimento em todas as fases de processo produtivo, ampla faixa de tolerância à salinidade, e à capacidade em aproveitar dietas com níveis protéicos variando de 20% a 40% (CASTRO; PAGANI, 2004; COSTA; SAMPAIO, 2004).

### 2.3 AÇÃO DA POLIFENOLOXIDASE EM CAMARÃO

O termo polifenoloxidasas (PPO), é geralmente utilizado para se referir a duas enzimas semelhantes envolvidas na oxidação de fenol na presença do oxigênio

molecular: tirosinases (EC1.14.18.1), que catalisam hidroxilação de monofenóis para o-difenóis (atividade monofenolase) e a oxidação de o-difenóis para o-quinonas (atividade difenolase), e catecoloxidase (EC 1.10.3.1) que só catalisam a oxidação de o-dihidroxifenóis para o-difenóis (GARCIA-MOLINA et al., 2005; ZAMORANO et al., 2009; NIRMAL E BENJAKUL, 2012). Nos crustáceos a PPO é uma enzima endógena distribuída principalmente na carapaça, seguido do exoesqueleto abdominal, cefalotórax, pleópodos e telson (ZAMORANO et al., 2009). Para Montero et al., (2001) a PPO em camarão é mais comumente encontrada na carapaça do cefalotórax. Ogawa et al., (1984) relataram que a enzima está localizada na carapaça do cefalotórax, na zona caudal (telson e urópodos) e na cutícula do abdômen, principalmente nas zonas onde os segmentos das cutículas se juntam. Outros pesquisadores afirmaram que a enzima está presente na membrana que cobre o músculo, no hepatopâncreas (onde é sintetizada) e na hemolinfa (NAKAGAWA E NAGAYAMA, 1981; BONO *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2010; GIMENEZ et al., 2010).

A PPO exerce várias funções fisiológicas importantes no desenvolvimento dos crustáceos, como esclerotização (endurecimento da carapaça) após a muda, cicatrização de lesões na cutícula, e participa nas reações de defesa (CARVALHO, 2005). É também responsável pelo desenvolvimento da melanose, escurecimento indesejável que ocorre na superfície da carapaça de camarão e lagosta, principalmente, causando uma drástica redução no valor comercial desses produtos. Apesar da sua aparência a melanose não oferece risco a saúde do consumidor.

O processo de melanose é acionado por um mecanismo bioquímico natural do camarão *post-mortem* o qual consiste na oxidação de substratos fenólicos para quinonas, catalisada pela enzima PPO. A polimerização não enzimática das quinonas incolores dá origem a pigmentos escuros, insolúveis e de alto peso molecular, as melaninas (MONTERO et al., 2004 ; GIMENEZ et al., 2010). Traumas causados durante a captura favorece a formação da melanose, sendo que o início e a intensidade de ocorrência diferem entre as espécies, variando com o ciclo de muda, métodos de despesca, manipulação e temperatura de armazenamento. Evidências sobre maior atividade de PPO coincidir com o estágio de muda da lagosta foram fornecidas por Bartolo e Birk (1998). Bono et al., (2010) pesquisando o camarão rosa, *Parapenaeus longirostris*, relataram que mudanças sazonais e fatores fisiológicos relacionados ao tamanho, sexo e período de desova podem alterar a atividade da polifenoloxidase em crustáceos. Eles

identificaram que a atividade de PPO foi maior durante o verão e que camarões machos juvenis apresentaram a maior atividade enzimática.

Nos crustáceos, a melanose é um processo rápido, a pigmentação surge de um a quatro dias após a captura, mesmo sob estocagem refrigerada, aparecendo antes que o produto seja deteriorado, caracterizando uma perda organoléptica, fazendo com que o consumidor rejeite o produto (YOKOHAMA, 2007; MONTERO et al., 2001). A refrigeração por si só não impede o desenvolvimento da melanose, apenas retarda, visto que a enzima permanece ativa durante todo o processamento *post-mortem*, a menos que o camarão seja congelado ou cozido. O mecanismo da reação de escurecimento em camarão começa na cabeça e depois se espalha para a cauda, diferindo entre as espécies a taxa de propagação. Esta diferença está relacionada aos níveis de substratos ou nível de concentração da enzima em cada espécie (SIMPSON et al., 1988).

A melanose é avaliada por inspeção visual através de um painel de julgadores treinados, os quais avaliam a melanose utilizando um escala de pontos de acordo com o grau de melanose. Bartolo e Birk (1998) e Montero et al., (2004) fizeram adaptações da escala proposta Otwell e Marshall (1986) diminuindo o número de estágios de melanose de camarão de 10 para 4 ou 5 estágios. Na Tabela 1 são apresentados os estágios de melanose proposto por Montero et al., (2004), para camarão da espécie *Parapenaeus longirostris*.

Tabela 1 - Escala e descrição do desenvolvimento de melanose em camarão.

<b>Estágios de melanose</b>	<b>Descrição</b>
1	Ausência
2	Leve a moderada (até 30% da superfície do corpo afetada)
3	Severo (30-70% da superfície do corpo afetada)
4	Extremamente severa (70-100% da superfície do corpo afetada)

Fonte: Montero et al., 2004

## 2.4 CONSERVAÇÃO DO PESCADO

O alto grau de perecibilidade do pescado, logo após a captura é devido às reações bioquímicas e químicas de origem autolítica, do próprio pescado, que degradam componentes musculares (OGAWA; MAIA, 1999; VIERA, 2004). Essas alterações são iniciadas pela ação autolítica das enzimas musculares que hidrolisam proteínas e lipídeos seguidos da ação dos micro-organismos sobre os compostos formados, causando alterações no sabor, cor, textura, caracterizando, portanto o nível de frescor ou de decomposição do pescado (MAYER, 2000). No caso específico do camarão, a tirosina é um aminoácido decorrente do desdobramento da proteína por ação de bactérias. A tirosina, na presença de oxigênio, é oxidada pela enzima PPO formando o-quinonas. Estes compostos bastantes reativos são polimerizados dando origem às melaninas, pigmentos escuros de alto peso molecular, responsável pela melanose no camarão. (MORAIS, 1981).

De acordo com Campanhone et al., (2002) o pescado é um alimento perecível a indústria pesqueira, e esta tem uma grande preocupação em aprimorar suas tecnologias de conservação a fim de conseguir um produto final de maior qualidade. Os métodos que utilizam baixas temperaturas são atualmente, os mais importantes na preservação das características sensoriais e no prolongamento da vida útil do produto (GONÇALVES; GINDRI JUNIOR, 2008).

Para Ogawa e Maia (1999) o uso do frio como método de conservação é eficaz visto que a velocidade de proliferação das bactérias e das reações química e enzimática envolvidas no processo de autólise depende principalmente da temperatura. Porém o resfriamento e o congelamento não contribuem para a melhoria da qualidade do produto do final, caso este não tenha alcançado os padrões de qualidade e higiene durante a captura, armazenamento e distribuição (CHEVALIER, et al., 2000; ARANNILEWA et al., 2005). O tipo de conservação utilizada irá definir o prazo de validade ou o tempo de conservação do produto. Entretanto, essa conservação deve ser tal que o alimento conserve ao máximo suas qualidades sensoriais e nutritivas, como também sua seguridade de consumo (OGAWA e MAIA et al., 1999).

## 2.5 USO DO FRIO NA CONSERVAÇÃO DO CAMARÃO

A refrigeração compreende os processos de resfriamento e congelamento. O resfriamento pode manter as características do alimento em seu estado original, mas o tempo de vida útil do produto é curto. No congelamento, o desenvolvimento de micro-organismos é bruscamente inibido devido ao aumento da concentração relativa de soluto e abaixamento da atividade de água nos tecidos (OGAWA e MAIA, 1999).

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1952), em seu Artigo 439, o pescado, em natureza, pode ser: fresco, resfriado ou congelado. Entende-se por fresco o pescado dado ao consumo sem ter sofrido qualquer processo de conservação, a não ser a ação do gelo. Entende-se por resfriado o pescado devidamente acondicionado em gelo e mantido em temperatura entre  $-0,5^{\circ}\text{C}$  e  $-2^{\circ}\text{C}$ . Por fim entende-se por congelado o pescado tratado por processos adequados de congelamento, em temperatura não superior a  $-25^{\circ}\text{C}$ .

Para Fennema (1985) o armazenamento sob refrigeração utiliza temperaturas acima de  $0^{\circ}\text{C}$  e abaixo de  $15^{\circ}\text{C}$ . Nessa faixa de temperatura é possível retardar o crescimento microbiano e as atividades metabólicas *post-mortem* dos tecidos animais, controlar as reações químicas deteriorativas, incluindo oxidações enzimática e lipídica e alterações químicas associadas com a modificação da cor, além de controlar a autólise do pescado e de evitar a perda de umidade e de nutrientes em geral e por fim obter um produto conservado. Segundo Ogawa e Maia (1999) para garantir e assegurar a qualidade química, microbiológica e sensorial o resfriamento do pescado deve ser feito logo após a despesca. É interessante registrar que pequenas alterações na temperatura podem ser efetivas no aumento da vida útil além de evitar ou retardar as reações químico-enzimáticas envolvidas no processo de autólise como também o desenvolvimento de micro-organismos que contribuem para a deterioração do pescado.

Temperaturas de resfriamento envolvem gelo ou refrigeração mecânica. Pode ser utilizado como método de conservação ou como de preservação temporária, até que outro processo seja aplicado. Alimentos perecíveis como os pescados podem ser estocados em gelo por um tempo limitado. De acordo com Vieira et al. (2004), o gelo utilizado na conservação do pescado deverá ser de ótima qualidade em relação ao seu aspecto bacteriológico, pois a qualidade deste afetará diretamente a qualidade do pescado. Os autores pontuam ainda que, para manter o contato com o pescado, o gelo

empregado para sua preservação deverá ser finamente triturado, pois qualquer pedaço grande poderá causar prejuízos ao pescado, dilacerando seus tecidos, dando assim possibilidade a um ataque bacteriano mais acelerado.

Para retardar o desenvolvimento da melanose, após a despesca, o camarão é imediatamente submetido ao resfriamento em temperatura inferior a 5 °C (LUCIEN, 2003). Ogawa e Maia (1999) evidenciaram que havendo minimização do estresse durante o sacrifício (anestesia com gelo - choque térmico) os substratos e enzimas se distribuem uniformemente nos tecidos tegumentares, evitando, desta forma, a concentração de substâncias nas regiões afetadas e diminuindo o nível de escurecimento. Araújo (2007) analisando camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* durante a estocagem em gelo encontrou valores de melanose considerados severos a partir do décimo dia de armazenamento.

O congelamento é um método de conservação amplamente utilizado pela indústria de pescado, por ser bastante efetivo contra o crescimento de micro-organismos e no retardamento de reações químicas minimizando as perdas nutritivas e sensoriais do produto. No entanto, durante o congelamento prolongado as reações físicas, químicas e biológicas continuam ocorrendo lentamente, causando alterações de textura, sabor e cor, perda de peso e de suculência, perda por gotejamento, desnaturação proteica, reações de hidrólise e a processos oxidativos, estas perdas são atribuídas a taxa de congelamento e descongelamento, temperatura de armazenamento, flutuações de temperatura, abuso de congelamento e descongelamento durante o armazenamento, transporte, exposição de varejo e consumo. (GONÇALVES e GINDRI JUNIOR, 2008; TSIRONIA et al., 2009; FENNEMA, 2010).

A taxa de congelamento é determinada de acordo com o método de congelamento os quais se classificam em congelamento por ar parado (freezer doméstico), por ar forçado (túnel de congelamento) e congelamento criogênico. No congelamento por ar parado a dissipação de calor é lenta (-25 °C), podendo causar danos às células do músculo e as suas proteínas, esse efeito é causado pela formação de grandes cristais de gelo, os quais se apresentam em menor quantidade e prevalecem na parte extracelular. O congelamento com ar forçado (-35 °C) permite a transferência rápida de calor, cristalizando a água intramuscular de maneira muito eficiente. Por fim o congelamento criogênico, que utiliza gases condensados como nitrogênio líquido (-195 °C), dióxido de carbono sólido ou gelo seco (-98 °C) é um método ultrarrápido de congelamento, o qual têm se mostrado vantajoso em relação ao método mecânico, pois



a rápida redução da temperatura permite uma melhor manutenção da qualidade do produto (OGAWA e MAIA, 1999; FENNEMA, 2010). Segundo Aquino et al., (2011) quando as membranas das organelas celulares são danificadas durante o congelamento, a liberação das enzimas nelas contidas e o contato com seus substratos, dos quais antes estavam separadas fisicamente, podem favorecer o início de algumas reações enzimáticas.

Em pesquisas realizadas por Gonçalves et al., (2008) o camarão tratado com fosfatos submetidos ao congelamento criogênico (nitrogênio líquido) apresentou maior rendimento quando comparado ao congelamento mecânico, e devido a baixa temperatura utilizada no processo reduziu perda de peso durante o descongelamento. Díaz-Tenorio et al., (2006) analisaram o efeito do descongelamento em camarão da espécie *Litopenaeus vannamei* congelado pelos métodos de congelamento criogênico (nitrogênio líquido) e congelamento por convecção forçada, observaram que o camarão submetido ao congelamento criogênico apresentou maior capacidade de retenção de água e menores prejuízos nas características de textura (força de cisalhamento, fraturabilidade e dureza) após o descongelamento. Os mesmos autores concluíram que o congelamento por nitrogênio líquido mantém a estrutura da célula muscular intacta, e que a vida de prateleira de camarão foi maior com o método congelamento criogênico do que o congelamento por ar forçado. Boonsumrej et al. (2007) ao analisar efeitos do congelamento e descongelamento nas variações da qualidade do camarão tigre *Penaeus monodon* congelado por jato de ar e por congelamento criogênico relataram que congelamento criogênico não provocou perdas na textura do produto. Segundo Rotllant et al., (2002) o congelamento rápido é um método coadjuvante na prevenção da melanose, permitindo a estocagem durante três meses sem alteração na aparência do camarão.

## 2.6 EMBALAGEM COM ATMOSFERA MODIFICADA

Segundo Parry (1993) a embalagem em atmosfera modificada (EAM) é um método baseado na eliminação do ar no interior do envase e substituição por um gás, ou mistura de gases, dependendo do tipo de produto. A finalidade desse tipo de embalagem é proporcionar uma vida de prateleira maior aos produtos alimentícios e prevenir ou

retardar qualquer alteração indesejável nas características sensoriais, nutritivas e microbiológicas dos alimentos. Para Genigeorgis (1985) existem duas categorias de atmosfera modificada empregada na conservação de alimentos: modificação da atmosfera por meio da adição de misturas de gases a embalagem e pela técnica de embalagem a vácuo. A embalagem a vácuo é definida por Parry (1995), como a forma mais simples do uso da atmosfera modificada o qual consiste no acondicionamento em embalagem de baixa permeabilidade ao oxigênio, onde o ar é retirado da embalagem e posteriormente soldada. Prentice et al., (2005) descreve o acondicionamento em embalagem com atmosfera modificada a vácuo como processo tecnológico de conservação de alimentos, onde o alimento é privado da exposição ao ar, o que permite maior controle no desenvolvimento de micro-organismos, reações químicas e enzimáticas, principais mecanismos de deterioração dos alimentos.

O processo da embalagem em atmosfera modificada por adição de gases é realizado pela substituição do ar, no interior da embalagem, por uma mistura de gases como oxigênio ( $O_2$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e nitrogênio ( $N_2$ ). O dióxido de carbono é o principal responsável pelo efeito bacteriostático. Seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas quando sua concentração na atmosfera é igual ou superior a 20%, ocorre redução do pH, interferência na atividade de algumas enzimas e no metabolismo do succinato, paralelamente a desidratação da membrana celular por bloqueio da migração de compostos hidrossolúveis para o interior da célula (PERRY, 1993; FRANCO, 2008). O nitrogênio é um gás inerte, insípido com baixa solubilidade em água e na gordura. O  $N_2$  é usado como um gás de enchimento, substituindo o  $O_2$  como uma alternativa da embalagem a vácuo, visto que, por ser pouco solúvel em água e gordura, é utilizado para limitar o colapso da embalagem causado pela absorção do  $CO_2$  pelo produto. O gás oxigênio geralmente estimula o crescimento de bactérias aeróbicas e inibe o crescimento de anaeróbias estritas, embora exista uma grande variação da sensibilidade de anaeróbios ao  $O_2$ . (PERRY, 1993; CHURCH, 1994; FRANCO, 2008).

Para Stammen et al., (1990) as principais modificações sensoriais que ocorrem em pescado embalado na presença de  $CO_2$  são odor ácido, descoloração, perda de umidade e alteração da textura. O odor ácido é causado pelo crescimento de bactérias ácido-láticas e rapidamente dissipado quando o produto é exposto ao ar; a descoloração ocorre devido ausência de  $O_2$  na atmosfera, sendo mais significativo em peixes com

carne escura; a acidificação do pH leva a maior perda de umidade e, consequentemente, a textura do pescado apresenta-se mais amolecida.

Escundini, (2010) estudando o efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a validade comercial de filé de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) concluiu que a utilização da embalagem em atmosfera modificada (100% CO<sub>2</sub>) apresentou melhores resultados no aumento de validade comercial de filés de tilápia estocados a 5 °C, mantendo a contagem de mesófilos e valores de pH em níveis aceitáveis durante 22 dias de estocagem. Bono et al., (2012) analisou o efeito combinado do congelamento e atmosfera modificada em diferentes misturas de gases (100% N<sub>2</sub>, 50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub> e vácuo) no controle da melanose em camarão *Parapenaeus longirostris* armazenado por um período de 12 meses. De acordo com o estudo a combinação de embalagem a vácuo e armazenamento congelado não pode ser utilizado para inibir ou retardar o escurecimento em camarão. Os autores explicam que este resultado pode ser relacionado com vestígios de ar atmosférico (isto é, oxigênio), que permaneceu no espaço entre os camarões por causa da dureza do exoesqueleto. Por outro lado, até os seis meses de armazenagem, as amostras acondicionadas em N<sub>2</sub> não mostraram quaisquer sinais de manchas pretas, observada nas amostras acondicionadas a vácuo. Este resultado corrobora as observações feitas por Adachi e Hirata (2011) comprovando que a melanose é induzido pelo oxigênio e, portanto, o método de embalagem de (100% de N<sub>2</sub>) podem ser usados para retardar o escurecimento *post-mortem* de camarão. Nas amostras embaladas em atmosfera contendo (50% CO<sub>2</sub> + 50% N<sub>2</sub>) foi possível observar uma ligeira perda da cor natural, entre o sexto e oitavo mês de armazenamento. Esta descoloração, provavelmente esta associado com oxidação lipídica, em vez da progressão da melanose.

Nirmal e Benjakul, (2011) verificaram o retardamento das alterações de qualidade de camarão branco (*Litopenaeus vannamei*), tratado com a combinação de extrato verde chá e embalagem em atmosfera modificada contendo uma mistura de gases (50%CO<sub>2</sub> + 45%N<sub>2</sub> + 5%O<sub>2</sub>). O efeito isolado desses dois tratamentos, durante o armazenamento refrigerado, comprovaram que o camarão tratado com o extrato de chá verde, rico em compostos fenólicos, antes do acondicionamento em atmosfera modificada apresentou a menor pontuação de melanose durante todo o período de estocagem e que a partir do quarto dia, o camarão tratado apenas com atmosfera modificada apresentou um aumento no escore da melanose.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

Foram adquiridos camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei*, inteiros e classificação 100-120 peças/kg provenientes de uma mesma empresa produtora, localizada no Estado da Paraíba. As amostras foram coletadas em ambiente de comercialização (entrepasto) e transportadas o Laboratório de Tecnologia e Processamento de Carnes e Pescado - LTPCP da Universidade Federal da Paraíba, devidamente acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo na proporção de 2:1 (gelo/camarão). As análises físicas e químicas foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia, Campus I, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

#### 3.2 TRATAMENTOS

##### 3.2.1 Congelamento

Camarão inteiro foi acondicionado em saco plástico com fecho e submetido aos seguintes congelamentos: freezer doméstico à  $(-18 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – FREEZER; túnel de congelamento a  $(-35 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – TÚNEL; nitrogênio líquido  $(-86 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – NITROGÊNIO. As amostras congeladas foram armazenadas à  $-18 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 90 dias e analisados em intervalos de 30 dias sendo descongeladas sob refrigeração  $(4 \text{ }^{\circ}\text{C})$  por 24 horas para realização das análises.

##### 3.2.2 Atmosfera modificada

As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas de baixa permeabilidade ao oxigênio, e submetidas às seguintes tratamentos: atmosfera modificada contendo  $(75\% \text{ CO}_2 + 25\% \text{ O}_2)$  – AM1; atmosfera modificada contendo  $(25\% \text{ CO}_2 + 75\% \text{ O}_2)$  –AM2 e embalagem a vácuo – VÁCUO. Posteriormente as amostras foram seladas em seladora TecMq modelo – TM150 e armazenadas sob

refrigeração a  $1\pm 1$  °C durante nove dias, as análises foram analisadas no intervalo de três dias.

### 3.2.3 Resfriamento em gelo

Camarões inteiros foi armazenado em contato direto com o gelo em escama, em caixas com isolamento térmico, durante nove dias sendo as análises realizadas no intervalo de três dias. A reposição do gelo e drenagem da água foi feita a cada 24h. O gelo utilizado foi obtido em ambientes de comercialização.

## 3.3 ANÁLISES QUÍMICA E FÍSICA

### 3.3.1 Atividade da polifenoloxidase

A determinação da atividade da polifenoloxidase foi obtida de acordo com o método descrito por Bono (2010), com modificações. O extrato enzimático foi obtido a partir do tecido rígido do camarão (carapaça do cefalotorax, exoesqueleto do abdômen, pereiópodes, pleópodos, úropodo e telson) e triturados em um processador doméstico e misturados a solução tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 7,2) previamente resfriados a 4 °C contendo NaCl 1M e 0,2% do detergente Triton-X 100. O uso de detergente garante a extração de enzimas ligadas à membrana celular devido ao seu caráter lipolítico. A proporção do extrato (camarão + tampão) foi de 1:3 (p.v). O extrato foi homogeneizado durante 30 minutos sob refrigeração e centrifugado a 3500 rpm por mais 30 minutos sob refrigeração a 4 °C. A atividade da PPO foi determinada utilizando uma mistura de reação constituído de 0,5 mL do extrato bruto, 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6,5) e 1,5 mL de substrato catecol 40mM, em tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6,5) perfazendo um total de 3,0 mL. O branco foi preparado igual a mistura reativa excluindo o substrato. A atividade enzimática foi medida a 475 nm, 25 °C durante 15 min em espectrofotômetro. Os resultados foram expresso em U, onde 1 U corresponde a um aumento na absorvância de 0,001/min/mL. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

### 3.3.2 Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado conforme descrito por Lowry et al., (1951), utilizando albumina de soro bovino. Os resultados foram expressos em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de extrato bruto.

### 3.3.3 Análise instrumental de cor

Foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Santos (2008), utilizando-se um colorímetro digital Minolta (Modelo CR-300, Minolta, Osaka, Japan). A cor foi determinada em três zonas (cabeça, corpo e cauda) no camarão inteiro. Foram feitas três repetições em triplicata.

### 3.3.4 Textura

As análises de textura foram realizadas em texturômetro utilizando célula de carga de 25 kg e programa aplicativo fornecido com o equipamento (Texture Expert for Windows, versão 1.19). Para medição da força de cisalhamento foi utilizada lâmina de aço inox HDP/BSK, a qual foi ajustada para transpassar verticalmente o segmento abdominal a 2 mm/s. A força máxima de cisalhamento, em Newton (N), foi automaticamente determinada pelo programa.

### 3.3.5 Potencial hidrogeniônico (pH)

Foi determinado utilizando-se um potenciômetro digital (DIGIMED, modelo pH 300M, São Paulo, Brasil), provido de um eletrodo de vidro (ANALYSER, modelo 2ª13-HG, São Paulo, Brasil), calibrado com solução tampão pH 7,0 e 4,0, seguindo os parâmetros descritos pelo método no 947.05 da AOAC (2000).

### 3.3.6 Atividade de água (Aa)

Foi realizada de acordo com o método 978.18, descrito pela AOAC (2000), utilizando-se um aparelho DECAGON (modelo PAWKIT, série P04266, São Paulo, Brasil).

### 3.4 ANÁLISE VISUAL DE MELANOSE

A melanose foi avaliada através de inspeção visual por um painel formado por seis julgadores treinados, utilizando uma escala de 4 pontos (MONTERO et al., 2004). Para obtenção da escala de pontuação foi criado um teste de resistência dos camarões, os quais foram mantidos sob refrigeração durante 14 dias, e registrados o grau de desenvolvimento de melanose, por meio de fotos. As fotos identificaram 4 estágios de desenvolvimento de melanose, conforme a Figura 2. A ficha de avaliação visual de melanose apresentada aos painelistas encontra-se em Anexo.





<b>Estágio</b>	<b>Descrição da Melanose</b>	<b>Exemplo</b>
<b>1</b>	<b>Ausente</b>	
<b>2</b>	<b>Leve a moderada</b> (até 30% da superfície do corpo afetada)	
<b>3</b>	<b>Severa</b> (de 30-70% da superfície do corpo afetada)	
<b>4</b>	<b>Extremamente severa</b> (de 70-100% da superfície do corpo afetada)	

Figura 2 - Estágios de desenvolvimento de melanose em camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*.

Fonte: Montero et al., 2004. Com adaptação.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos resultados das análises foi realizada por meio de análises de variância (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado (DIC), utilizando o programa SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008). Os dados foram analisados em função do tempo de armazenamento e por comparação dos métodos de congelamento utilizando o teste Tukey ao nível de 5 % de significância.



## REFERÊNCIAS

- ADACHI, K.; HIRATA, T. Blackening of crustaceans during storage: mechanism and prevention. In C. Alasalvar, F. Shahidi, K. Miyahita, e U. Wanasundara (Eds.), **Handbook of seafood quality, safety and health applications** (p. 109-118). UK: Blackwell Publishing Ltd 2011.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Washington D.C.: AOAC, 2000. 1018 p.
- AQUINO, A. C. M. S.; MOÉS, R. S.; CASTRO, A. A. Estabilidade de ácido ascórbico, carotenoides e antocianinas de frutos de acerola congelados por métodos criogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 2, p. 154-163, 2011.
- ARAÚJO, D. C. Avaliação do programa nacional de desenvolvimento da aquicultura: o caso da carcinicultura marinha no nordeste. 2003. 139f. **Dissertação**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- ARANNILEWA, S. T.; SALAWU, S. O.; SORUNGBE, A. A.; OLA-SALAWU, B. B. Effect of frozen period on the chemical, microbiological and sensory quality of frozen tilapia fish (*Sarotherodon galilaeus*). **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.8, p.852-855, 2005.
- ARAÚJO, I. W. F. Avaliação da qualidade do camarão *Litopenaeus vannamei* tratado com inibidores de melanose e estocado em gelo. 2007. 93f. **Dissertação**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAMARÃO (ABCC). Análise da produção e do Mercado interno e externo do camarão cultivado. **Revista da ABCC**, n.1, p.18-23, 2010.
- BARBIERI JÚNIOR, R. C.; OSTRENSKY NETO, A. **Camarões marinhos: reprodução, maturação, larvicultura**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2001. 243 p.
- BARTOLO, I.; BIRK, E. O. Some factors affecting Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) cuticle polyphenol oxidase activity and blackspot development. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 329–336, 1998.
- BONO, G.; BADALUCCO, C. V.; CORRAO, A.; CUSUMANO, S.; MAMMINA, L.; PALMEGIANO, G. B. Effect of temporal variation, gender and size on cuticle

polyphenol oxidase activity in deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **Food Chemistry**, v.123, p. 489-493, 2010.

BONO, G.; BADALUCCO, C. V.; CUSUMANO, S.; PALMEGIANO, G. B. Toward shrimp without chemical additives: A combined freezing -MAP approach. **LWT - Food Science and Technology**, v.46, p. 274-279, 2012.

BOONSUMREJ, S.; CHAIWANICH SIRI, S.; TANTRATIAN, S.; SUZUKI, T.; TAKAI, R. Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 292-299, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952 e alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25-06-62, nº 1.236 de 02-09-94, nº 812 de 08-02-96 e Decreto nº 2.444 de 04-07-97.

CAMPANONE, L. A.; ROCHE, L. A.; SALVADORI, V. O.; MASCHERONI, R. H. Monitoring of weight in meat products during freezing and frozen storage. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 229-238, 2002.

CARVALHO, R. **Camarões marinhos gestão na qualidade e rastreabilidade na fazenda**. Recife: ABBCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 95p, 2005.

CASTRO, A. A.; PAGANI, G. D. Secagem e composição química da cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei boone*) a diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 2, p. 123-129, 2004.

CHEVALIER, D.; LE BAIL, A.; GHOU, M. Freezing and ice crystals formed in a cylindrical food model: part I. Freezing at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, v. 46, p. 277-285, 2000.

COSTA, E. F.; SAMPAIO, Y. Geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva do camarão marinho cultivado. **Revista Economia Aplicada**, v. 8, n. 2, p. 1-19, 2004.

CHURCH, N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. **Trends in Food Science e Technology**, v. 5, p. 345-352, 1994.

DÍAZ-TENORI, L. M.; GARCÍA-CARREÑO, F. L.; PACHECO-AGUILAR, R. Comparison of freezing and thawing treatments on muscle properties of whiteleg shimp (*Litopenaues vannamei*), **Journal of Food Biochemistry**, v. 31, p. 563–576, 2007.

ESCU DINI, J. R. O.; BASTOS, P. B.; FRANCO, R. M.; BAPTISTA, R. F.; M. S. Efeito da embalagem em atmosfera modificada sobre a validade comercial de filé de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 21-24, 2010.

FAO. **Food And Agriculture Organization. Fisheries and Aquaculture Department**. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>>. Acesso em: 06 de Junho de 2012.

FENNEMA, O. **Water and ice**. In: Fennema, O.R. Food Chemistry, New York: Marcel Dekker, p. 13-39, 1985.

FENNEMA, Owen R. et al. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre : Artmed, 2010.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p. 36-41, 2008.

FONSECA, S. B. et al. Cultivo do camarão marinho em água doce em diferentes densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1352-1358, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo, Editora Atheneu, 174p, 2008.

GARCIA-MOLINA, F.; PENALVER, M. J.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N.; GARCIA-CANOVAS, F.; TUDELA, J. Enzymatic method with polyphenoloxidase for the determination of cysteine and N -acetylcysteine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6183–6189, 2005.

GIMENEZ, B.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; MONTERO, P.; GOMEZ-GUILLEN, M. C. Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 1240-1245, 2010.

GONÇALVES, A. A.; GINDRI JUNIOR, C. S. G. Optimization of the freezing process of red shrimp (*Pleoticus muelleri*) previously treated with phosphates, **International Journal of Refrigeration**, v. 31, n. 7, p. 1134-1144, 2008.

GONÇALVES, A. A.; RIBEIRO, J. L. D. Do phosphates improve the seafood quality reality and legislation, **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 3, p. 237-247, 2008.

GENIGEORGIS, C. Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1, p. 237-251, 1985.

GRYSCHKE, S. F. B.; OETTERER, M.; GALLO, C. R. Characterization and frozen storage stability of minced Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 12, n. 3, p. 57-69, 2003.

HUANG, J.; YANG, Y.; WANG, A. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, p. 240-244, 2010.

KAI, M.; MORAIS, C. Vias de Deterioração do Pescado. In: KAI, M.; RUIVO, U.E. **Controle de Qualidade do Pescado**. Santos: Leopoldianum, p. 13-20, 1988.

LOPES, M. L. B.; COSTA, P. A.; SANTOS, J. S. B.; CUNHA, S. J. T.; SANTOS, M. A. S.; SANTANA, A. C. **Mercado e Dinâmica espacial da Cadeia Produtiva da pesca e Aquicultura na Amazônia**. Banco da Amazônia, Belém, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCIEN, H. Processo de despesca do camarão “hoso” (*Head on Shell on*). **Revista Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, Recife, ano 5, n.1, p.90-96, mar. 2003.

MONTERO, P.; LOPEZ-CABALLERO, M. E.; PEREZ-MATEOS, M.. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). **Journal of Food Science**, v. 66, p. 1201-1206, 2001.

MONTERO, P.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, O.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Effectiveness of Onboard Application of 4-Hexylresorcinol in Inhibiting Melanosis in Shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **JFS C: Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, n. 8, 2004.

MORAIS, C.; KAI, M. Considerações sobre o enlatamento de camarão em salmoura. **Boletim Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 425-488, 1981.

NAKAGAWA, T., e NAGAGAYAMA, F. Distribution of catechol oxidase in crustaceans. **Bulletin of the Japanese Society of Science Fisheries**, v. 47, p. 1645, 1981.

NATORI, M. M.; SUSSEL, F. R.; SANTOS, E. C. B.; PREVIERO, T. C.; VIEGAS, E. M. M.; GAMEIRO, A. H. **Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios**. Informações Econômicas, v.41, n. 2, 2011.

NIRMAL, N. P.; BENJAKUL, S. Use of tea extracts for inhibiting of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 924-932, 2011.

NIRMAL, N. P.; BENJAKUL, S. Inhibition kinetics of catechin and ferulic acid on polyphenoloxidase from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Food Chemistry**, v. 131, p. 569-573, 2012.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. v.1, 430 p.

OSTRENSKY NETO, A. **Aquicultura brasileira e sua sustentabilidade**. XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 2002, Anais. p. 4-10.

PARRY, R. T. **Envasado de los alimentos en atmósfera modificada**. Madrid (España): A. Madrid Vicente, 1995.

POERSCH, L.; CAVALLI, R.O.; WASIELESKY JÚNIOR, W.; CASTELLO, J.P.; PEIXOTO S.R.M. Perspectivas para o desenvolvimento dos cultivos de camarões marinhos no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1337-1343, 2006.

PRENTICE, C.; SAINZ, R. L. Cinética de deterioração apresentada por filés de carpa-capim (*Ctenopharyngodon idella*) embalados a vácuo sob diferentes condições de refrigeração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, Jan./Mar. 2005.

ROCHA, I. de P.; RODRIGUES, J.; AMORIN, L. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 6, p. 30-36, 2004.

ROTLLNT, G.; ARNAU, F.; GARCÍA, J. A.; GARCÍA, N.; RODRÍGUEZ, M.; SARDÁ, F. Effect of metaspulphite treatments and freezing on melanosis inhibition in rose shrimp *Aristeus antennatus*. **Food Science Technology International**, v. 8, n. 4, p. 243-247, 2002.

SIMPSON, B. K.; MARSHALL, M. R.; OTWEEL, W. S. Phenoloxidases from pink and white shrimp: Kinetic and other properties. **Journal of Food Biochemistry**, v. 12, p. 205-217, 1988.

SANTOS, F. Os segredos do modelo CIE Lab. Boletim Infoprepress, n 14, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.infoprepress.ppg.br/boletim14/bolmaio.html>>. Acesso em: 26 jun. 2012.

STAMMEN, K.; GERDES, D.; CAPORASO, F. Modified atmosphere packaging of seafood. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 301-331, 1990.

SOCCOL, M. C. H.; OETTERER, M. Use of modified atmosphere in seafood preservation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 4, p. 569-580, 2003.

TSIRONIA, T.; DERMESONLOUGLOUA, E.; GIANNAKOULO, M.; TAOUKIS, P. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. **Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 664-671, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F. Microbiota natural do pescado fresco. In: Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática. São Paulo; Varela, 2004. Cap.4, p. 45-58.

ZAMORANO, J. P.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; MONTERO, P.; GOMEZ-CUILLEN, M. C. (). Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwaterpink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **Food Chemistry**, v. 112, p. 104-111, 2009.

YOKOYAMA, V.A. Qualidade do camarão da espécie *Xyphopenaues kroyeri* mediante a ação dos agentes antimelanóticos. **Dissertação**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ARTIGO 1

<sup>1</sup>Elaborado de acordo com as normas da Revista Ciência e Agrotecnologia

#### **ESTABILIDADE FÍSICO E QUÍMICA DO CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) SUBMETIDO A DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELAMENTO<sup>1</sup>**

Lucivânia Assis de Oliveira

José Marcelino Oliveira Cavaleiro

Maria Margareth Rolim Martins Rocha

João Andrade da Silva

Heinz Johann Holschuh

Alinne Gouveia dos Anjos

#### **RESUMO**

O escurecimento *post-mortem* do camarão é um dos principais fatores de deterioração, este processo é denominado de melanose e é causado por um processo bioquímico, iniciado na presença de oxigênio, pela ação catalizadora da polifenoloxidase (PPO) endógena do camarão. O uso de baixas temperaturas pode inibir ou reduzir a atividade da polifenoloxidase, as quais são responsáveis pela formação de melaninas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade enzimática da (PPO) em camarão cultivado congelado. Na pesquisa, foram utilizados camarões inteiros da espécie *Litopenaeus vannamei*, submetidos aos seguintes congelamentos: freezer doméstico à  $(-18 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – FREEZER; túnel de congelamento a  $(-35 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – TÚNEL;



nitrogênio líquido (-86 °C) – NITROGÊNIO. As amostras foram armazenadas a -18 °C durante 90 dias. Os resultados mostraram que o tempo e o método de congelamento influenciaram na atividade da PPO e no desenvolvimento da melanose. O congelamento em nitrogênio líquido foi mais eficiente na inibição da atividade da PPO e no retardamento da melanose durante os 90 dias de armazenamento. Quanto aos parâmetros físicos foram observado algumas alterações tais como redução na atividade de água e luminosidade ( $L^*$ ), aumento no pH, e força de cisalhamento em todos os métodos de congelamentos avaliados .

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, conservação, melanose, parâmetros físicos.

## ABSTRACT

The darkening postmortem Shrimp is one of the main factors of deterioration, this process is called melanosis and is caused by a biochemical process, initiated in the presence of oxygen, the catalytic action of polyphenol oxidase (PPO) endogenous shrimp. The use of low temperatures can inhibit or reduce the activity of polyphenyloxidase, which are responsible for the formation of melanins. The aim of this study was to evaluate the activity of the enzyme (PPO) in frozen farmed shrimp. In the research we used whole shrimp species *Litopenaeus vannamei* which were submitted to the following freezes: the domestic freezer ( $-18 \pm 1$  ° C) - FREEZER; tunnel freezing at ( $-35$  ° C) - TUNNEL, liquid nitrogen ( $-86$  ° C) - NITROGEN The samples were stored ( $-18$  ° C) for 90 days. The results showed that time and freezing method influence the enzymatic activity of PPO and in the development of melanose. The method by freezing in liquid nitrogen proved to be more effective in inhibiting PPO activity and delayed melanosis during the 90 days of storage. As for the physical parameters were observed

some changes such as reduction in water activity and lightness ( $L^*$ ), increase in pH, and shear force in all methods evaluated freezes.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, conservation, melanosis, physical parameters.

## INTRODUÇÃO

O camarão é um produto com alto valor comercial no setor pesqueiro e apresenta tendências no aumento do consumo. Sua produção mundial é proveniente principalmente do cultivo no qual está em pleno crescimento em comparação com a produção oriunda do extrativismo (FAO, 2010).

Nos crustáceos a PPO é uma enzima endógena distribuída na carapaça, exoesqueleto abdominal, cefalotórax, pleópodos e telson (ZAMORANO et al., 2009). Essa enzima exerce várias funções fisiológicas importantes no desenvolvimento dos crustáceos, como esclerotização (endurecimento da carapaça) após a muda, cicatrização de lesões na cutícula, além de participar nas reações de defesa do animal (CARVALHO, 2005). É também responsável pelo desenvolvimento da melanose, escurecimento indesejável que ocorre na superfície da carapaça de camarão e lagosta, principalmente. O processo de melanose é acionado por um mecanismo bioquímico natural da morte do camarão e consiste na oxidação de substratos fenólicos para quinonas, catalisada pela enzima PPO. A polimerização não enzimática das quinonas incolores dá origem a pigmentos escuros, insolúveis de alto peso molecular, as melaninas (MONTERO, et al., 2004 ; GIMENEZ et al., 2010). No camarão, como em outros crustáceos, a melanose é um processo rápido que provoca pigmentação em um a quatro dias após a captura, mesmo em estocagem refrigerada, aparecendo antes que o produto seja deteriorado,

caracterizando uma perda organoléptica, fazendo com que o consumidor rejeite o produto (YOKOHAMA, 2007; MONTERO et al., 2001).

Portanto, uma das principais preocupações do setor produtivo de camarão está relacionada ao surgimento de melanose. A melanose, quando considerada severa nestes crustáceos, pode causar grandes perdas econômicas devido ao considerável valor destes produtos no mercado. Uma maneira de controlar esse problema é a utilização do frio, pois além de retardar a melanose, as baixas temperaturas são capazes de preservar as características físicas, químicas e sensoriais desses produtos garantindo ao consumidor final um produto de boa qualidade. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade enzimática da polifenoloxidase em camarão cultivado submetidos a diferentes métodos de congelamento e armazenados por 90 dias.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei*, provenientes de empresa beneficiadora, localizada no Estado da Paraíba. As amostras foram coletadas em ambiente de comercialização e transportadas para o Laboratório de Tecnologia e Processamento de Carnes e Pescado - LTPCP da Universidade Federal da Paraíba, devidamente acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo na proporção de 2:1 (gelo/camarão). Posteriormente, os camarões inteiros foram acondicionados em saco plástico com fecho e submetidos aos seguintes congelamentos: freezer doméstico à  $(-18 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – FREEZER; túnel de congelamento a  $(-35 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – TÚNEL; nitrogênio líquido  $(-86 \text{ }^{\circ}\text{C})$  – NITROGÊNIO. As amostras foram armazenadas à  $-18 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 90 dias e avaliados em intervalos de 30 dias sendo descongeladas sob refrigeração  $(4 \text{ }^{\circ}\text{C})$  por um período de 24 horas para realização das análises.

A atividade da polifenoloxidase foi determinada de acordo com o método descrito por Bono et al., (2010), com modificações. O extrato enzimático foi obtido a partir do tecido rígido do camarão (carapaça do cefalotorax, exoesqueleto do abdômen, pereiópodes, pleópodos, úropodo e telson) triturados em um processador doméstico e misturados a solução tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 7,2) previamente resfriados a 4 °C contendo NaCl 1M e 0,2% do detergente Triton-X 100. O uso de detergente garante a extração de enzimas ligadas à membrana celular devido ao seu caráter lipolítico. A proporção do extrato (camarão + tampão) foi de 1:3 (p.v). O extrato foi homogeneizado durante 30 minutos sob refrigeração e centrifugado a 3500 rpm por mais 30 minutos sob refrigeração a 4 °C. A atividade da PPO foi determinada utilizando uma mistura de reação constituída de 0,5 mL do extrato bruto, 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6,5) e 1,5 mL de substrato catecol 40 mM, em tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6,5) perfazendo um total de 3,0 mL, o branco foi preparado igual a mistura reativa excluindo o substrato. A atividade enzimática foi medida a 475 nm, 25 °C durante 15 min em espectrofotômetro. Os resultados são expressos em U, 1 U corresponde a um aumento na absorvância de 0,001/min/mL. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Lowry et al., (1951). Utilizando albumina de soro bovino. Os resultados foram expressos em  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de extrato bruto.

Foram realizadas análises das propriedades físicas, tais como: atividade de água, realizada de acordo com o método 978.18 (AOAC, 2000); pH, seguindo os parâmetros descritos pelo método 947.05 (AOAC, 2000); cor, utilizando-se um colorímetro digital Minolta (Modelo CR-300, Minolta, Osaka, Japan) conforme especificações da Comissão Internationale de L'éclairage (CIE, 1986) e textura, realizadas em

texturômetro utilizando célula de carga de 25kg e programa aplicativo fornecido com o equipamento (Texture Expert for Windows, versão 1.19).

A melanose foi determinada pela inspeção visual de seis avaliadores treinados, utilizando uma escala de 4 pontos (MONTERO et al., 2004). Os avaliadores foram orientados a dar pontuação de melanose (de 1 a 4), em que 1 = ausência completa de pontos negros; 2 = alguns pontos pequenos na carapaça; 3 = considerável mancha na carapaça, 4 = substancial manchas sobre o camarão inteiro. A avaliação estatística dos resultados das análises físicas e químicas foi realizada por análises de variância (ANOVA), seguido de análise de regressão a 5 % de significância. Utilizou-se o programa SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008).

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Na Tabela 1 estão descritos os valores da atividade da PPO, atividade específica da PPO e teor de proteína nos extratos obtido da carapaça do camarão congelado por diferentes métodos e armazenados à  $-18 \pm 1$  °C. Os métodos de congelamento em freezer doméstico e túnel de amônia tiveram pouco efeito na redução da atividade enzimática e atividade específica da PPO no camarão, apresentando valores estatisticamente semelhantes durante o armazenamento. No camarão congelado em nitrogênio líquido a atividade enzimática e atividade específica diminuiu significativamente ( $p < 0.05$ ), durante o período de armazenamento, havendo uma redução média de 43,8% na atividade da enzima e 28,5% na atividade específica em relação ao dia inicial do experimento. As amostras congeladas em freezer e túnel de congelamento tiveram reduções na atividade enzimática de 9,22 e 23,3%, respectivamente e aumento na atividade específica da PPO no final do experimento.

**Tabela 1** - Atividade enzimática (U), teor de proteína (mg.mL<sup>-1</sup>) e atividade específica (AE) da PPO do camarão cultivado congelado sob diferentes métodos e armazenado (-18 ± 1 °C) por um período de 90 dias.

		PERÍODO DE ESTOCAGEM (DIAS)			
PARÂMETRO	MÉTODO*	0	30	60	90
U	FREEZER	47,7±6,4 <sub>aA</sub>	55,8±5,52 <sub>aA</sub>	45,8±5,99 <sub>aA</sub>	43,3±3,40 <sub>aB</sub>
	TÚNEL	47,7±6,4 <sub>aA</sub>	48,5±6,77 <sub>abA</sub>	43,2±0,40 <sub>aA</sub>	36,6±1,22 <sub>abB</sub>
	NITROGÊNIO	47,7±6,4 <sub>aA</sub>	39,8±3,30 <sub>aB</sub>	30,5±5,00 <sub>bBC</sub>	26,8±12,8 <sub>bC</sub>
Proteína (mg.mL <sup>-1</sup> )	FREEZER	1,85±0,12 <sub>aA</sub>	1,22±0,11 <sub>aAB</sub>	1,14±0,16 <sub>aB</sub>	1,05±0,40 <sub>aB</sub>
	TÚNEL	1,85±0,12 <sub>aA</sub>	1,56±0,01 <sub>bAB</sub>	1,55±0,04 <sub>bB</sub>	1,44±0,07 <sub>bB</sub>
	NITROGÊNIO	1,85±0,12 <sub>aA</sub>	1,74±0,09 <sub>bA</sub>	1,74±0,08 <sub>bA</sub>	1,64±0,01 <sub>cA</sub>
AE (U.mg <sup>-1</sup> de proteína)	FREEZER	24,2±3,24 <sub>aA</sub>	45,7±4,09 <sub>aB</sub>	40,2±4,39 <sub>aB</sub>	38,4±8,21 <sub>aBC</sub>
	TÚNEL	24,2±3,24 <sub>aA</sub>	31,1±4,33 <sub>aB</sub>	27,7±0,26 <sub>bAB</sub>	25,3±7,84 <sub>bB</sub>
	NITROGÊNIO	24,2±3,24 <sub>aA</sub>	32,1±3,13 <sub>aA</sub>	27,4±3,44 <sub>bAB</sub>	17,3±1,75 <sub>bB</sub>

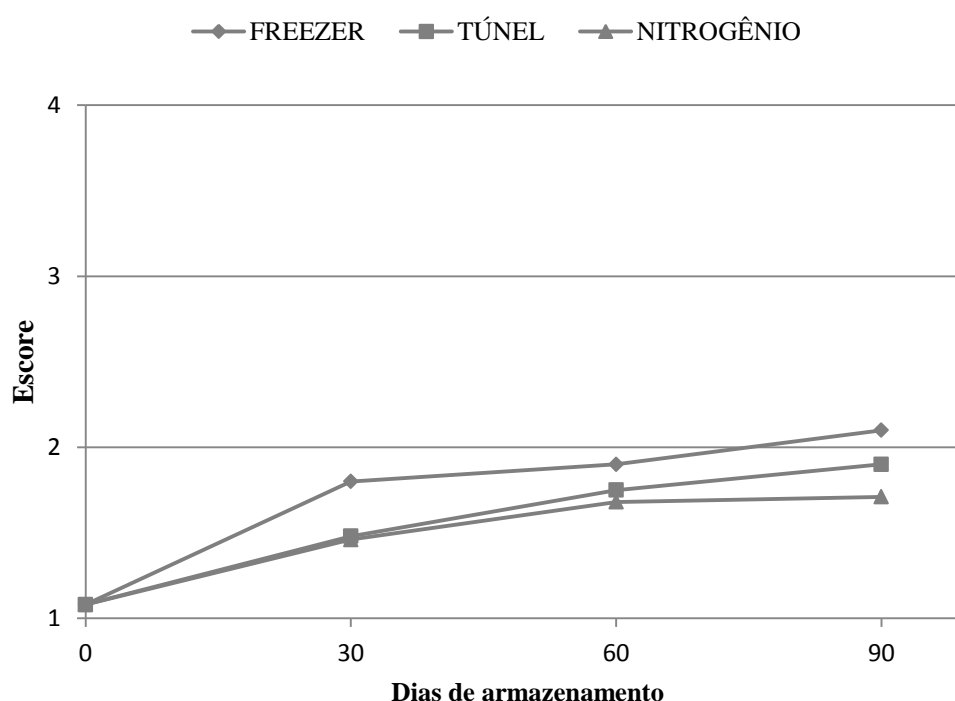
\*Método de congelamento. 1 Letras diferentes na mesma coluna (a-b) indicam diferença significativa (p<0,05) para métodos de congelamento. 2 Letras diferentes na mesma linha (A-B) indicam diferença significativa (p < 0,05) para tempo. FREEZER: Congelamento em freezer doméstico(-18° C); TÚNEL: Congelamento em túnel de amônia (-35 °C); NITROGÊNIO: Congelamento em nitrogênio líquido (-86° C).

Quanto ao teor de proteína, a redução desde constituinte nas amostras congeladas após 90 dias de armazenamento a -18°C foram 11,4; 22,3 e 43,4% para as amostras congeladas em nitrogênio líquido, túnel de amônia e freezer doméstico, respectivamente.

O baixo efeito redutor na atividade da PPO das amostras congeladas em freezer doméstico está relacionado ao fato que, os alimentos quando congelados lentamente, formam-se cristais de gelo grandes e pontiagudos, localizados predominantemente nas regiões extracelulares. A formação destes cristais em tecidos animais pode levar a danos irreversíveis à membrana celular destruindo a organização interna das células, levando a uma desintegração celular (CHEFTEL et al., 1982; RESENDE, 1995). Quando as membranas das organelas celulares são danificadas durante o congelamento, a liberação das enzimas nelas contidas e o contato com seus substratos, dos quais antes estavam separadas fisicamente, podem favorecer o início de algumas reações enzimáticas. (BARTOLOME et al., 1996). Dessa forma, o baixo poder na redução da atividade enzimática no congelamento em freezer doméstico, pode ter sido decorrente da formação de cristais de gelos grandes os quais são capazes de romper estruturas celulares e promover a mistura de enzima e substrato, antes separados por diferentes compartimentos celulares iniciando a reação enzimática.

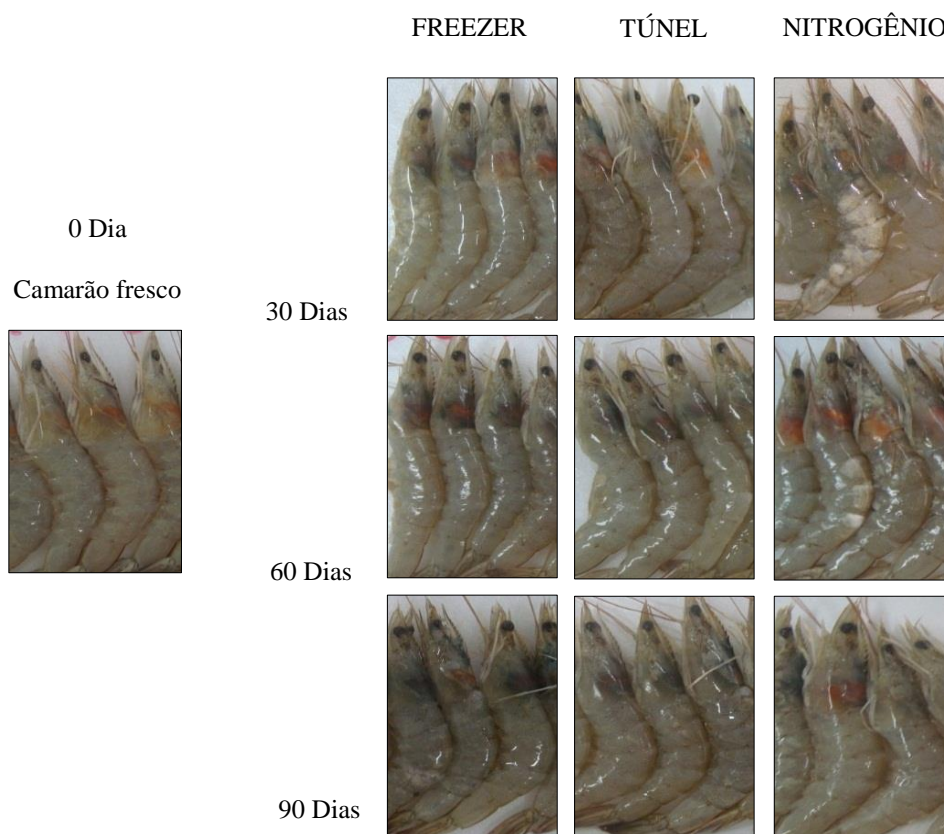
A PPO é também responsável pelo desenvolvimento da melanose, esse escurecimento enzimático indesejável ocorre na superfície da carapaça do camarão, sendo acionada por um mecanismo bioquímico natural, depois da morte do camarão, consiste na oxidação de substratos fenólicos a quinonas, catalisada pela enzima PPO (MONTERO et al., 2004; GIMÉNEZ et al., 2010). Os resultados da avaliação da melanose estão apresentados nas Figuras 1 e 2, onde pode ser observado que no início do armazenamento o camarão fresco apresentou um estágio de melanose com nota  $1,08 \pm 0,10$ , indicando, portanto ausência de melanose. Aos trinta dias de armazenamento os métodos de congelamento em túnel de amônia e em nitrogênio líquido apresentaram desenvolvimento de melanose estatisticamente semelhantes, com uma pontuação de  $1,48 \pm 0,40$  e  $1,46 \pm 0,40$ , respectivamente. O congelamento em freezer deferiu

estatisticamente dos métodos anteriores apresentando um acréscimo acentuado no escore de melanose de  $1,80 \pm 0,30$ . À medida que o tempo de armazenamento foi aumentando houve um aumento contínuo na pontuação de melanose em todos os métodos de congelamento. Porém, o método de congelamento em freezer doméstico apresentou no final de noventa dias de armazenamento pontuação superior a dois, o que já representa um produto desvalorizado comercialmente.



**Figura 1** – Escores de estágio de melanose em camarões cultivados congelados sob diferentes métodos e armazenados ( $-18 \pm 1$  °C) por um período de 90 dias. FREEZER: Congelamento em freezer doméstico ( $-18^{\circ}$  C); TÚNEL: Congelamento em túnel de amônia ( $-35$  °C); NITROGÊNIO: Congelamento em nitrogênio líquido ( $-86^{\circ}$  C).



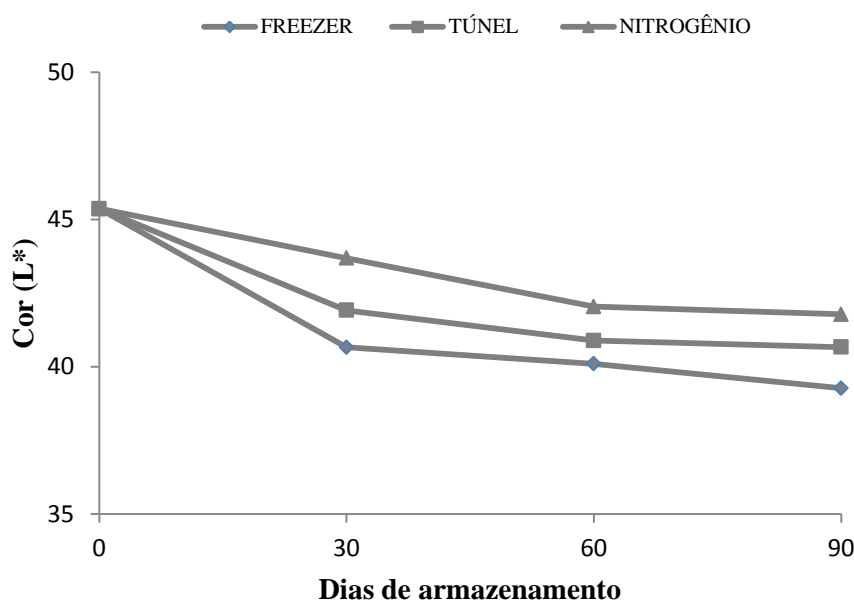


**FIGURA 2** – Fotografia de camarão cultivado congelado sob diferentes métodos de congelamento e armazenado a  $(-18 \pm 1^\circ \text{C})$  por de 90 dias. FREEZER: Congelamento em freezer doméstico  $(-18^\circ \text{C})$ ; TÚNEL: Congelamento em túnel de amônia  $(-35^\circ \text{C})$ ; NITROGÊNIO: Congelamento em nitrogênio líquido  $(-86^\circ \text{C})$ .  
Fonte: Autoria própria.

Um comparativo entre atividade enzimática da PPO e desenvolvimento da melanose durante o período de armazenamento não observou uma relação direta entre a atividade da PPO com grau de surgimento da melanose. Durante todo o armazenamento como também entre os diferentes métodos de congelamento a atividade da PPO demonstrou flutuações significativas, tendo aos 90 dias uma atividade relativamente baixa, não coincidindo com o valor alto de melanose para o mesmo tempo de armazenamento. Portanto, o efeito inibitório parcial na atividade da PPO não foi suficiente para retardar a melanose. Este fato pode ser explicado pelo mecanismo duplo na formação de melaninas. A reação começa pela ação enzimática da polifenoloxidase,

onde os monofenóis são hidrolizados formando quinonas incolores. Subsequentemente, a polimerização das quinonas por um mecanismo não enzimático dá origem à acumulação de pigmentos escuros de elevado peso molecular, as melaninas, e consequentemente a formação da melanose. Bartolo e Birk (1998) investigando a relação da atividade da PPO com desenvolvimento da melanose em lagosta ao longo de vários meses de congelamento, não encontraram uma correlação entre a atividade da PPO e o desenvolvimento inicial da melanose. Esses autores identificaram que a maior atividade das PPO coincide com o estágio de muda da lagosta, e que existe uma correlação positiva entre o estresse sofrido pelo animal durante o abate e a maior atividade deste complexo enzimático. Adachi et al., (2001) estudando as propriedades das enzimas PPO e HdPO (hemocianina derivada da fenoloxidase) do camarão sugeriram que o desenvolvimento da mancha preta durante o armazenamento congelado é atribuído principalmente pela HdPO. A hemocianina é um pigmento presente no sangue dos crustáceos responsável pelo transporte do oxigênio, quimicamente é uma molécula de proteína que contém cobre na sua estrutura. Segundo Adachi et al., (2001) a hemocianina pode ser convertida em hemocianina fenoloxidase, enzima do tipo HdPO, a qual apresentam propriedades bioquímicas semelhantes a PPO, porém muito menos suscetível ao congelamento do que a PPO durante o armazenamento congelado. Este resultado confirma as pesquisas apresentados por López-Caballero et al., (2007) que relatam que o nível de atividade de PPO do camarão *Parapenaeus longirostris* diminui ao longo do tempo de estocagem de  $34 \text{ U mL}^{-1}$  no início do armazenamento a  $10 \text{ U mL}^{-1}$  após 14 dias de armazenamento a  $(2 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C})$  porém a pontuação de melanose continuou aumentando chegando ao escore 4, considerado estágio de melanose extremamente severa, ao final do armazenamento.

O parâmetro  $L^*$  sofreu variação significativa durante o período de armazenamento (Figura 3). Quanto menor o parâmetro  $L^*$  mais avançado o estágio de desenvolvimento da melanose. A luminosidade ( $L^*$ ) diminuiu ao longo do tempo mostrando valores mais baixos aos 90 dias de estocagem coincidindo desta forma o desenvolvimento da melanose, em todos os métodos de congelamento.



**FIGURA 3** - Avaliação dos valores de  $L^*$  do camarão cultivado congelado sob diferentes métodos e armazenados a  $-18 \pm 1$  °C por 90 dias. FREEZER: Congelamento em freezer doméstico ( $-18^\circ$  C); TÚNEL: Congelamento em túnel de amônia ( $-35$  °C); NITROGÊNIO: Congelamento em nitrogênio líquido ( $-86$  °C).

Na Tabela 2 estão os valores de pH, atividade de água (Aa), e textura das amostras do camarão congelado por diferentes m e armazenados à  $-18 \pm 1$  °C. A atividade de água não apresentou diferença significativa entre os métodos de congelamento ( $p > 0,05$ ), como também ao longo do tempo de estocagem, o maior e o menor valor encontrado foram  $0,99 \pm 0,00$  a  $0,97 \pm 0,01$ , respectivamente. O pH apresentou diferença significativa entre os métodos de congelamento ( $p < 0,05$ ), aos 30

e 60 dias, porém não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os métodos de congelamento após 90 dias de estocagem. Em relação ao tempo de estocagem todos os métodos de congelamento apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ). Os valores iniciais de pH obtidos foram próximos da neutralidade  $7,15 \pm 0,12$ , e a partir dos 30 dias de armazenamento verificou-se um acréscimo acentuado principalmente no método de congelamento em freezer doméstico. Aos 90 dias de armazenamento, o pH apresentou valores igual e superior a 8,00 no entanto visualmente mantinha aparência de um produto “fresco”.

**Tabela 2** - Parâmetros físicos do camarão cultivado congelado sob diferentes métodos e armazenado a  $-18 \pm 1$  °C durante 90 dias.

PARÂMETRO	MÉTODO*	PERÍODO DE ESTOCAGEM (DIAS)			
		0	30	60	90
pH	FREEZER	$7,15 \pm 0,12_{aA}$	$7,66 \pm 0,55_{aA}$	$7,70 \pm 0,55_{aA}$	$8,19 \pm 0,22_{aB}$
	TÚNEL	$7,15 \pm 0,12_{aA}$	$7,33 \pm 0,13_{abA}$	$7,42 \pm 0,03_{bA}$	$8,04 \pm 0,02_{aB}$
	NITROGÊNIO	$7,15 \pm 0,12_{aA}$	$7,19 \pm 0,12_{bA}$	$7,40 \pm 0,08_{bA}$	$8,00 \pm 0,16_{aB}$
Aa	FREEZER	$0,99 \pm 0,00_{aA}$	$0,98 \pm 0,00_{aA}$	$0,98 \pm 0,00_{aA}$	$0,97 \pm 0,01_{aA}$
	TÚNEL	$0,99 \pm 0,00_{aA}$	$0,99 \pm 0,00_{bA}$	$0,98 \pm 0,00_{aA}$	$0,97 \pm 0,00_{aA}$
	NITROGÊNIO	$0,99 \pm 0,00_{aA}$	$0,99 \pm 0,00_{bA}$	$0,98 \pm 0,00_{aA}$	$0,97 \pm 0,00_{aA}$
Textura (N)	FREEZER	$8,90 \pm 0,00_{aA}$	$10,13 \pm 0,01_{aB}$	$16,30 \pm 0,01_{aC}$	$10,55 \pm 0,06_{aB}$
	TÚNEL	$8,90 \pm 0,00_{aA}$	$9,13 \pm 0,00_{bB}$	$14,05 \pm 0,02_{bC}$	$10,33 \pm 0,03_{aA}$
	NITROGÊNIO	$8,90 \pm 0,00_{aA}$	$8,65 \pm 0,01_{bA}$	$10,06 \pm 0,01_{cB}$	$10,29 \pm 0,02_{aB}$

\*Método de congelamento. 1 Letras diferentes na mesma coluna (a-b) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para métodos de congelamento. 2 Letras diferentes na mesma linha (A-B) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para tempo. FREEZER: Congelamento em freezer doméstico ( $-18^\circ \text{C}$ ); TÚNEL: Congelamento em túnel de amônia ( $-35^\circ \text{C}$ ); NITROGÊNIO: Congelamento em nitrogênio líquido ( $-86^\circ \text{C}$ ).

Segundo Vongsawasdi e Noomhorm (2000), alterações bioquímicas como o aumento de BVT por ação de micro-organismos e enzimas tissulares, promovem a elevação do pH muscular. A legislação brasileira considera deteriorado e, portanto, impróprio para o consumo, o pescado com pH da carne externa superior ou igual a 6,8, e da carne interna superior ou igual a 6,5 (BRASIL, 1952). Mendes et al., (2005) consideram aceitáveis, do ponto de vista sensorial, no camarão *Parapenaeus longirostris*, com pH igual ou inferior a 7,9. Ogawa e Maia et al., (1999) não consideram confiável o índice de pH para avaliar o grau de frescor ou início da deterioração em pescado, devido este parâmetro apresentar variação entre diferentes espécies e indicar oscilações durante o período de estocagem. Tsironia et al., (2009) avaliando a qualidade do camarão congelado durante o armazenamento prolongado em diferentes temperaturas relataram pH inicial de 6,95 aumentando para 7,93 após 39 dias (-5 °C) e 7,85 após 74 dias (-8 °C). Para Gryscek et al., (2003) o comportamento do pH durante o armazenamento, sob congelamento, é dependente da temperatura de estocagem, composição em sais, estado fisiológico, poder tampão das proteínas e ação enzimática.

A força de cisalhamento obtida neste trabalho apresentou um acréscimo em função do tempo (Tabela 3). Aos 60 dias de armazenamento no qual o método de congelamento em freezer doméstico apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos os outros métodos. Aos 90 dias as amostras congeladas em freezer domestico e túnel de amônia sofreram decréscimo na força de cisalhamento em relação aos 60 dias, enquanto que amostra do congelado em nitrogênio líquido manteve-se inalterado.

Aumento da força de cisalhamento sobre os efeitos do congelamento e descongelamento nas variações da qualidade do camarão tigre *Penaeus monodon*

congelado por jato de ar e de congelamento criogênico foi relatado por Boonsumrej et al. (2007). Para Srinivasan et al., (1997) o tamanho do feixe do músculo tem um efeito importante sobre a maciez da carne do camarão. Diferença forças de cisalhamento entre camarão do mesmo tamanho pode ser causado pelas composições diferentes, principalmente no teor de colágeno (BENJAKUL et al., 2008).

### CONCLUSÕES

O método de congelamento utilizando nitrogênio líquido foi mais efetivo na inibição da atividade da PPO e no retardamento da melanose que os métodos de congelamento em freezer e congelamento túnel amônia, durante os 90 dias armazenamento. Quanto aos parâmetros físicos foram observadas algumas alterações tais como redução na atividade de água e luminosidade ( $L^*$ ) e aumento no pH, e na força de cisalhamento.

### AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Rede de Pesquisa de Carcinicultura Nacional (RECARCINA), pelo auxílio financeiro. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de mestrado.

### REFERÊNCIAS

ADACHI, K.; HIRATA, T.; NAGAGAI, K.; SAKAGUCHI, M. (). Hemocyanin: a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. **Journal of Food Science**, v.66, p. 1130 e 1136, 2001.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Washington D.C.: AOAC, 2000. 1018 p.

BARTOLO, I.; BIRK, E. O. Some factors affecting Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) cuticle polyphenol oxidase activity and blackspot development. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 329–336, 1998.

BARTOLOME, A. P.; RUPEREZ, P.; FUSTER, C. Freezing rate and frozen storage effects on color and sensory characteristics of pineapple fruit slices. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 154–160, 1996.

BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KIJROONGROJANA, K.; SRIKET, P. Effect of heating on physical properties and microstructure of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Penaeus vannamei*) meats. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1066–1072, 2008.

BONO, G.; BADALUCCO, C. V.; CORRAO, A.; CUSUMANO, S.; MAMMINA, L.; PALMEGIANO, G. B. Effect of temporal variation, gender and size on cuticle polyphenol oxidase activity in deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **Food Chemistry**, v. 123, p. 489–493, 2010.

BONO, G.; BADALUCCO, C. V.; CUSUMANO, S.; PALMEGIANO, G. B. Toward shrimp without chemical additives: A combined freezing -MAP approach. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, p. 274–279, 2012.

BOONSUMREJ, S.; CHAIWANICH SIRI, S.; TANTRATIAN, S.; SUZUKI, T.; TAKAI, R. Effects of freezing and thawing on the quality changes of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) frozen by air-blast and cryogenic freezing. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 292–299, 2007.

BRASIL. Decreto no. 30691 de 29/03/52. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília: SIPA, DICAR, Ministério da Agricultura, 1952.

CARVALHO, R. **Camarões marinhos gestão na qualidade e rastreabilidade na fazenda**. Recife: ABBCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 95p, 2005.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H.; BESANÇON, L. **Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, v. 2, 1982.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p. 36–41, 2008.

GRYSCHKE, S. F. B.; OETTERER, M.; GALLO, C. R. Characterization and frozen storage stability of minced Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis spp.*). **Journal os Aquatic Food Product Techology**, v. 12, n. 3, p. 57–69, 2003.

LOPEZ-CABALLERO, M. E.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; GOMEZ-GUILLEN, M. C.; MONTERO, P. Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1029–1038, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistery**, v.193, p. 265–275, 1951.

MONTERO, P.; LOPEZ-CABALLERO, M. E.; PEREZ-MATEOS, M.. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). **Journal of Food Science**, v. 66, p. 1201–1206, 2001.

MONTERO, P.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, O.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Effectiveness of Onboard Application of 4-Hexylresorcinol in Inhibiting Melanosis in Shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **JFS C: Food Chemistry and Toxicology**, v. 69, Nr. 8, 2004.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. São Paulo: Varela, 1999. v.1, 430 p.

RESENDE, J. V.; CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Crioproteção de frutos de abacaxis submetidos a congelamento com ar estático. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 1, p. 31–45, 2004.



SRINIVASAN, S.; XIONG, Y. L.; BLANCHARD, S. P.; TIDWELL, J. H. Physicochemical changes in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) subjected to multiple freeze–thaw cycles. **Journal of Food Science**, v.62, p. 123–127, 1997.

TSIRONIA, T.; DERMESONLOUOGLOUA, E.; GIANNAKOUROUA, M.; TAOUKIS, P. Shelf life modelling of frozen shrimp at variable temperature conditions. **Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.664–671, 2009.

VONGSAWASDI, P.; NOOMHORM, A. Effects of handling methods on quality changes of giant freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 9, n. 3, p. 57–71, 2000.

ZAMORANO, J. P.; MARTINEZ-ALVAREZ, O.; MONTERO, P.; GOMEZ-CUILLEN, M. C. Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwaterpink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **Food Chemistry**, v. 112, p. 104–111, 2009

## ARTIGO 2

<sup>1</sup>Submetido à Revista Ciência Rural

### **Avaliação da atividade da polifenoloxidase no camarão acondicionado em atmosfera modificada<sup>1</sup>**

*Evaluation of polyphenol oxidase activity shrimp packaged in modified atmosphere*

**Lucivânia Assis de Oliveira, José Marcelino Oliveira Cavaleiro, Maria  
Margareth Rolim Martins Rocha, João Andrade da Silva, Heinz Johann  
Holschuh, Jussara Santos de Santana**

#### **RESUMO**

A polifenoloxidase (PPO) é um complexo enzimático endógeno do camarão capaz de induzir a formação da melanose depois a despesca. A melanose consiste na oxidação de substratos fenólicos a quinonas, catalisada pela enzima PPO na presença do oxigênio. A polimerização não enzimática das quinonas dá origem a pigmentos escuros, as melaninas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade da PPO em camarão cultivado acondicionado em diferentes atmosferas e em contato com gelo. Foi utilizado camarão inteiro da espécie *Litopenaeus vannamei* submetido aos seguintes tratamentos: refrigeração em gelo escama – GELO; atmosfera modificada (75%CO<sub>2</sub>/25%O<sub>2</sub>) – AM1; atmosfera modificada (25%CO<sub>2</sub>/75% O<sub>2</sub>) – AM2; e embalagem a vácuo – VÁCUO. Os resultados mostraram que nenhum dos tratamentos analisados conseguiu inibir de forma efetiva a atividade da PPO. No que diz respeito à melanose a amostra embalada a vácuo mostrou-se mais eficiente controlando o escurecimento até o nono dia mantendo

inclusive a cor inicial. Quanto aos parâmetros físicos a amostra embalada a vácuo apresentaram valores maiores para o parâmetro L\* e valores mais baixos para pH, textura e atividade de água durante o armazenamento quando comparando com os outros tratamentos.

**Palavras-chave:** *Litopenaeus vannamei*, polifenoloxidase, melanose, atmosfera modificada.

## ABSTRACT

The polyphenol oxidase (PPO) is an enzyme complex endogenous shrimp capable of inducing the formation of melanosis in shrimp post-mortem. The melanosis consists in the oxidation of phenolic substrates to quinones, catalyzed by the enzyme PPO in the presence of oxygen. The non-enzymatic polymerization of quinones gives rise to dark pigments, melanins. The aim of this study was to evaluate the activity of PPO in farmed shrimp packaged in different atmospheres and in contact with ice. Was used, shrimps *Litopenaeus vannamei* species of the following treatments: cooling on ice scale in an isothermal box - ICE, modified atmosphere (75% CO<sub>2</sub>/25% O<sub>2</sub>) - AM1; modified atmosphere (25% CO<sub>2</sub>/75% O<sub>2</sub>) - AM2, and vacuum packaging - VACUUM. The results showed that none of the treatments analyzed could effectively inhibit the activity of PPO. With respect to the melanosis vacuum treatment was more efficient dimming control until the ninth day including maintaining the initial color. As to the physical parameters of the vacuum treatment had higher values for parameter L\* and lowest values for pH, texture and water activity during storage when compared to other treatments.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, polyphenoloxidase, melanosis, modified atmosphere.

## INTRODUÇÃO

Nos crustáceos a polifenoloxidase (PPO) é uma enzima endógena distribuída principalmente na carapaça, seguido do exoesqueleto abdominal, cefalotórax, pleópodos e telson, exercem várias funções importantes no desenvolvimento desses animais como esclerotização (endurecimento da carapaça) após a muda, cicatrização de lesões na cutícula além de participar nas reações de defesa (CARVALHO, 2005; ZAMORANO et al., 2009). Para Montero et al., (2001), a PPO em camarão é mais comumente encontrada na carapaça do cefalotórax. A PPO também está envolvida na formação da melanose durante o armazenamento do camarão causando importante perda de qualidade, embora não seja necessariamente um indicador de deterioração, a melanose diminui a qualidade visual ocasionando uma drástica redução no seu valor comercial. O processo de melanose consiste na oxidação de substratos fenólicos a quinonas, catalisada pelo PPO. A polimerização não enzimática das quinonas da origem a pigmentos escuros de alto peso molecular, as melaninas (MONTERO et al., 2004; GIMÉNEZ et al., 2010).

O cultivo de camarão marinho no litoral brasileiro, principalmente no nordeste, representa um importante segmento no setor pesqueiro, em função do seu valor comercial. A conservação após despesca do camarão é considerada um ponto crítico devido à perecibilidade, o que afeta a logística de distribuição e consumo. As pesquisas com embalagem em atmosfera modificada vêm ao encontro dessa necessidade, pois buscam aumentar a validade comercial do camarão com a manutenção de suas características de frescor. Outro fator preponderante para a manutenção da qualidade do camarão é o resfriamento rápido em gelo logo após a despesca e o controle de sua

temperatura em torno de 0 °C. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da embalagem em atmosfera modificada e do resfriamento em gelo sobre a atividade enzimática da polifenoloxidase em camarão cultivado armazenados por nove dias.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Nesta pesquisa, a matéria-prima empregada foi o camarão marinho inteiro da espécie *Litopenaeus vannamei*, com classificação 100-120 peças/kg. As amostras foram coletadas em ambiente de comercialização (entreposto) e transportadas para o Laboratório de Tecnologia e Processamento de Carnes e Pescado - LTPCP da Universidade Federal da Paraíba, devidamente acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo na proporção de 2:1 (gelo/camarão). As análises físicas e químicas foram realizadas nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Alimentos do Centro de Tecnologia, Campus I, da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

Uma parte da amostra foi acondicionada em embalagens plásticas de baixa permeabilidade nas seguintes atmosferas: AM1-atmosfera modificada contendo (75%CO<sub>2</sub>/25%O<sub>2</sub>); AM2: atmosfera modificada contendo (25%CO<sub>2</sub>/75%O<sub>2</sub>); e VÁCUO: embalagem a vácuo, as embalagens foram seladas em seladora TecMaq modelo – TM150 e armazenadas sob refrigeração a 1±1 °C. Outra parte da amostra foi armazenada em contato direto com o gelo em escama (GELO), em caixas com isolamento térmico. As amostras foram armazenadas por nove dias e as análises realizadas no intervalo de três dias.

A determinação da atividade enzimática da polifenoloxidase foi realizada de acordo com o método descrito por Bono (2010), com modificações. O extrato enzimático foi obtido a partir do tecido rígido do camarão (carapaça do cefalotorax,

exoesqueleto do abdômen, pereiópodes, pleópodos, úropodo e telson) e triturados em um processador doméstico e misturados a solução tampão fostato de sódio 0,05M (pH 7,2) previamente resfriados a 4 °C contendo NaCl 1M e 0,2% do detergente Triton-X 100. O uso de detergente garante a extração de enzimas ligadas à membrana celular devido ao seu caráter lipolítico. A proporção do extrato (camarão + tampão) foi de 1:3 (p·v). O extrato foi homogeneizado durante 30 minutos sob refrigeração e centrifugado a 3500 rpm por mais 30 minutos sob refrigeração a 4 °C. A atividade da PPO foi determinada utilizando uma mistura de reação constituído de 0,5 mL do extrato bruto, 1,0 ml de tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6,5) e 1,5 mL de substrato catecol 40 mM, em tampão fosfato de sódio 0,05M (pH 6,5) perfazendo um total de 3,0 mL, o branco foi preparado igual a mistura reativa excluindo o substrato. A atividade enzimática foi medida a 475 nm, 25 °C durante 15 mim em espectrofotômetro. Os resultados são expressos em U, onde 1 U corresponde a um aumento na absorvância de 0,001/min/mL. Todas as leituras foram realizadas em triplicata. O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Lowry et al., (1951). Utilizando albumina de soro bovino. Os resultados foram expressos em  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de extrato bruto.

Foram realizadas análises das propriedades físicas, tais como: atividade de água, realizada de acordo com o método nº 978.18 (AOAC, 2000); pH, seguindo os parâmetros descritos pelo método nº 947.05 (AOAC, 2000); cor, utilizando-se um colorímetro digital Minolta (Modelo CR-300, Minolta, Osaka, Japan) e textura, realizadas em texturômetro utilizando célula de carga de 25kg e programa aplicativo fornecido com o equipamento (Texture Expert for Windows, versão 1.19).

A melanose foi determinada pela inspeção visual de seis avaliadores treinados, utilizando uma escala de 4 pontos (MONTERO et al., 2004). Os avaliadores foram orientados a dar pontuação de melanose (1 a 4), em que 1 = ausência completa de

pontos negros; 2 = alguns pontos pequenos na carapaça; 3 = considerável mancha na carapaça, 4 = substancial manchas sobre o camarão inteiro. A avaliação estatística dos resultados das análises físicas e químicas foi realizada por análises de variância (ANOVA), seguido de análise de regressão a 5 % de significância. Utilizou-se o programa SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2008).

## RESULTADOS E DISCUSÕES

Na Tabela 1 estão descritos os valores da atividade enzimática, teor de proteínas e atividade específica da polifenoloxidase (PPO) do camarão cultivado acondicionado em diferentes atmosferas sob refrigeração e armazenado em gelo escama. Observou-se que a atividade enzimática e a atividade específica da PPO foi maior na amostra submetida ao resfriamento em gelo escama (GELO) e menor na amostra embalada a vácuo (VÁCUO). Adachi e Hirata (2011) relataram que a diminuição do oxigênio nas embalagens provoca redução significativa da atividade enzimática. Com relação ao tempo de estocagem todos os tratamentos tiveram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade enzimática e atividade específica da PPO no terceiro dia de armazenamento seguido de um decréscimo até o final do experimento.

Os escores de melanose estão apresentados na Figura 1. No dia inicial de armazenamento, o camarão não apresentou melanose recebendo, portanto escore  $1,15 \pm 0,10$ . No terceiro dia de armazenamento os tratamentos AM1 e a vácuo apresentaram desenvolvimento de melanose estatisticamente semelhantes, porém a partir do sexto dia o tratamento AM1 teve um aumento considerável no desenvolvimento da melanose tornando-se um produto inaceitável. Os tratamentos AM2 e GELO apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na melanose no terceiro dia de armazenamento. O

tratamento a vácuo foi o mais efetivo no controle da melanose até o nono dia mantendo inclusive a cor inicial (Figura 2).

Nirmal e Benjakul, (2011) estudaram o efeito isolado e combinado da embalagem com atmosfera modificada contendo (50%CO<sub>2</sub>/5%O<sub>2</sub>/45%N<sub>2</sub>) com o extrato de chá verde no retardamento da melanose do *Litopenaeus vannamei* durante o armazenamento refrigerado. Constataram que durante o armazenamento, a melanose foi mais pronunciada no controle e que no geral, a pontuação de melanose foi aumentada em todas as amostras durante o tempo de armazenamento.

Quanto ao parâmetro luminosidade (L\*), mostrado na Figura 3, o tratamento AM2 apresentou uma maior redução no valor (L\*) durante o período de armazenamento indicando, portanto maior desenvolvimento no estágio da melanose. A amostra embalada a vácuo manteve-se quase que constante até o sexto dia de armazenamento apresentando uma pequena redução no nono dia de armazenamento. Na Tabela 2 estão apresentados os valores de pH, atividade de água (Aa) e textura das amostras do camarão refrigerados sob diferentes atmosferas e em contato com o gelo em escama por um período de 9 dias. A atividade de água não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ), entre os tratamentos durante o tempo de estocagem, o maior e o menor valor encontrados foram  $0,99 \pm 0,00$  a  $0,98 \pm 0,01$ , respectivamente. O pH inicial no camarão fresco foi 7,30, este valor está de acordo com os valores relatados por Bono et al., (2012) para a espécie *Parapenaeus longirostris*. Ao terceiro dia de armazenamento não se identificou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), entre os tratamentos analisados nem em relação ao tempo. Após o sexto dia de armazenamento observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em todas as amostras. Segundo Nirmal e Benjakul (2009b), o aumento do valor de pH do camarão durante o armazenamento refrigerado ou congelado é resultado do acúmulo de compostos gerados a partir dos processos autolíticos



ocasionados por enzimas endógenas ou de origem microbianas. Em pesquisas realizadas por Bono et al., (2012) foi verificado que o camarão embalado a vácuo obteve um pH menor em relação ao camarão embalado em atmosferas contendo 100% N<sub>2</sub> ou 50%N<sub>2</sub>/50%CO<sub>2</sub>.

Os valores de textura do camarão submetidos aos tratamentos AM1 e AM2 não apresentaram diferença ( $p < 0,05$ ) durante o período de armazenamento. Na amostra embalada a vácuo verificou-se um aumento no terceiro dia de armazenamento diminuindo à medida que o tempo de armazenamento foi aumentando. Já na amostra acondicionada em gelo, os valores de textura aumentaram até o sexto dia de armazenamento tendo uma diminuição no final do armazenamento. Arvanitoyannis, et al., (2011) avaliaram a textura do camarão da espécie *Melicerus kerathurus* embalados em duas diferentes atmosferas (60 % CO<sub>2</sub> +40% N<sub>2</sub>) e (92,9% N<sub>2</sub>+5,1% CO<sub>2</sub> +2% O<sub>2</sub>) armazenados por 5 dias a 3 °C e constataram que o camarão armazenado na segunda atmosfera conseguiu reter valores de textura mais próximos dos valores iniciais em torno de 7,8 N e maiores até o final do experimento que aqueles armazenados na primeira atmosfera.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que nenhum dos tratamentos analisados foi eficaz na inibição da atividade da PPO durante o tempo de armazenamento. A embalagem a vácuo retardou o escurecimento até o nono dia mantendo inclusive a cor inicial. O camarão embalado a vácuo sofreu menores alterações nos parâmetros físicos analisados com L\* (luminosidade), pH, textura e atividade de água quando comparando com as demais

amostras. Portanto, a embalagem a vácuo mantida sob refrigeração pode ser uma alternativa viável no controle da melanose e na qualidade física do camarão.

## AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Rede de Pesquisa de Carcinicultura Nacional (RECARCINA), pelo auxílio financeiro. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS

ADACHI, K., & HIRATA, T. (2011). Blackening of crustaceans during storage: mechanism and prevention. In C. Alasalvar, F. Shahidi, K. Miyahita, & U. Wanasundara (Eds.), **Handbook of seafood quality, safety and health applications** (pp. 109 e118). UK: Blackwell Publishing Ltd.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Washington D.C.: AOAC, 2000. 1018 p.

ARVANITOYANNIS, I. S.; VASILIKI, K.; BOULETIS, A. D.; PAPALOUCAS C. Study of changes in physicochemical and microbiological characteristics of shrimps (*Melicerus kerathurus*) stored under modified atmosphere packaging. **Anaerobe**, v.17, p.292–294, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.04.006>>. Acesso em: 17 fev. 2012. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.04.006.

CARVALHO, R. **Camarões marinhos gestão na qualidade e rastreabilidade na fazenda**. Recife: ABBCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 95p, 2005.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p. 36–p41, 2008.

GIMÉNEZ, B.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, O.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*). **LWT – Food Science and Technology**, v.43, p.1240–1245, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.017>>. Acesso em: 23 abr. 2012. doi:10.1016/j.lwt.2010.02.017.

NIRMAL, N. P.; BENJAKUL, S). Melanosis and quality changes of Pacific whiteshrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.3578–3586, 2009b. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf900051e>>. Acesso em: 04 mai. 2012. doi:10.1021/jf900051e.

NIRMAL, N. P.; BENJAKUL, S. Use of tea extracts for inhibition of polyphenol oxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, p.924–932, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.007>>. Acesso em: 04 mai. 2012. doi:10.1016/j.lwt.2010.12.007.

NIRMAL, N. P.; BENJAKUL, S. Inhibition kinetics of catechin and ferulic acid on polyphenol oxidase from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Food Chemistry**, v.131, p.569–573, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.025>>. Acesso em: 18 ago. 2012. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.025.

MONTERO, P.; LOPEZ-CABALLERO, M. E.; PEREZ-MATEOS, M. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). **Journal of Food Science**, v.66, p. 1201–1206, 2001. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2001.tb16105.x/abstract>>. Acesso em: 23 mar. 2012. doi: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb16105.x.

MONTERO, P.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, O.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Effectiveness of Onboard Application of 4-Hexylresorcinol in Inhibiting Melanosis in Shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **JFS C: Food Chemistry and Toxicology**, v.69, nr.8, 2004. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09913.x/abstract>. Acesso em: 21 mar. 2012. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb09913.x

ZAMORANO, J. P.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, O.; MONTERO, P.; GOMÉZ-GUILLÉN, M. C. (). Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwaterpink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **Food Chemistry**, v.112, p.104–111, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.061>>. Acesso em: 19 mai. 2012. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.061.

Tabela 1 – Médias e desvio padrão da atividade enzimática (U), teor de proteína (mg) e atividade específica (AE) da PPO do camarão refrigerados sob diferentes atmosferas e em contato em gelo escama por um período de nove dias.

PARÂMETRO	TRATAMENTO	PERÍODO DE ESTOCAGEM (DIAS)			
		0	3	6	9
U	AM1	43,3±2,10 <sub>aA</sub>	52,3±6,20 <sub>aAB</sub>	39,0±2,20 <sub>aB</sub>	26,0±2,70 <sub>aC</sub>
	AM2	43,3±2,10 <sub>aA</sub>	69,6±6,30 <sub>bB</sub>	38,0±2,20 <sub>aA</sub>	24,0±3,60 <sub>aC</sub>
	VÁCUO	43,3±2,10 <sub>aA</sub>	49,0±2,20 <sub>aA</sub>	39,8±3,30 <sub>aB</sub>	27,0±4,50 <sub>aC</sub>
	GELO	43,3±2,10 <sub>aA</sub>	102,7±3,20 <sub>cB</sub>	79,0±16,0 <sub>bC</sub>	49,0±2,50 <sub>bA</sub>
Proteína (mg)	AM1	1,72±0,00 <sub>aA</sub>	1,06±0,00 <sub>aBC</sub>	1,33±0,40 <sub>aC</sub>	0,66±0,40 <sub>aB</sub>
	AM2	1,72±0,00 <sub>aA</sub>	1,09±0,10 <sub>aB</sub>	1,00±0,00 <sub>abB</sub>	1,00±0,10 <sub>aB</sub>
	VÁCUO	1,72±0,00 <sub>aA</sub>	1,03±0,30 <sub>aB</sub>	1,00±0,00 <sub>abB</sub>	1,66±0,01 <sub>aA</sub>
	GELO	1,72±0,00 <sub>aA</sub>	1,21±0,30 <sub>aB</sub>	0,66±0,30 <sub>bB</sub>	1,00±0,00 <sub>bB</sub>
AE (U/mg)	AM1	25,6±1,20 <sub>aA</sub>	49,2±2,80 <sub>aB</sub>	39,4±10,0 <sub>aB</sub>	31,8±10,1 <sub>aAB</sub>
	AM2	25,6±1,20 <sub>aA</sub>	64,4±4,30 <sub>aA</sub>	29,6±2,20 <sub>aA</sub>	19,7±1,30 <sub>bA</sub>
	VÁCUO	25,6±1,20 <sub>aA</sub>	46,6±23,2 <sub>aA</sub>	35,2±3,20 <sub>aA</sub>	19,4±1,30 <sub>bA</sub>
	GELO	25,6±1,20 <sub>aA</sub>	85,4±6,70 <sub>aAB</sub>	126,7±29,1 <sub>bB</sub>	35,1±1,10 <sub>bA</sub>

1 Letras diferentes na mesma coluna (a-b) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para tratamentos resfriados. 2 Letras diferentes na mesma linha (A-B) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para tempo. AM1: Atmosfera modificada contendo (75% CO<sub>2</sub> e 25% O<sub>2</sub>); AM2: Atmosfera modificada contendo (25% CO<sub>2</sub> e 75% O<sub>2</sub>).

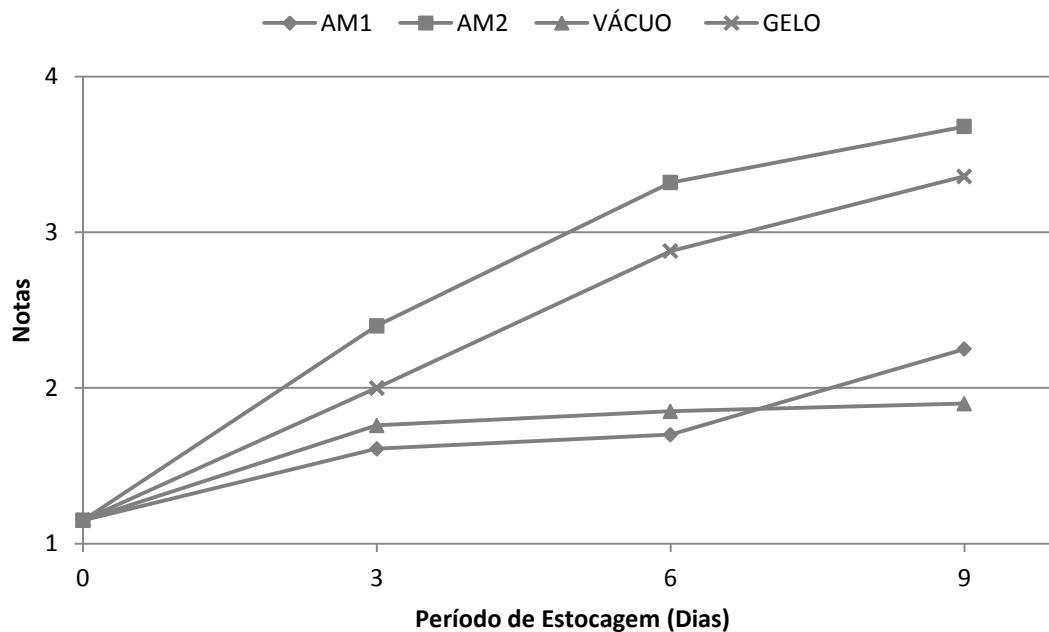


Figura 1 – Escores de estágio de melanose em camarão cultivado armazenando em diferentes atmosferas e em gelo escama por um período de 9 dias. 1: Ausência de melanose; 2: Melanose leve a moderada; 3: Melanose severa e 4: Melanose extremamente severa. AM1: Atmosfera modificada contendo (75% CO<sub>2</sub> e 25% O<sub>2</sub>); AM2: Atmosfera modificada contendo (25% CO<sub>2</sub> e 75% O<sub>2</sub>).

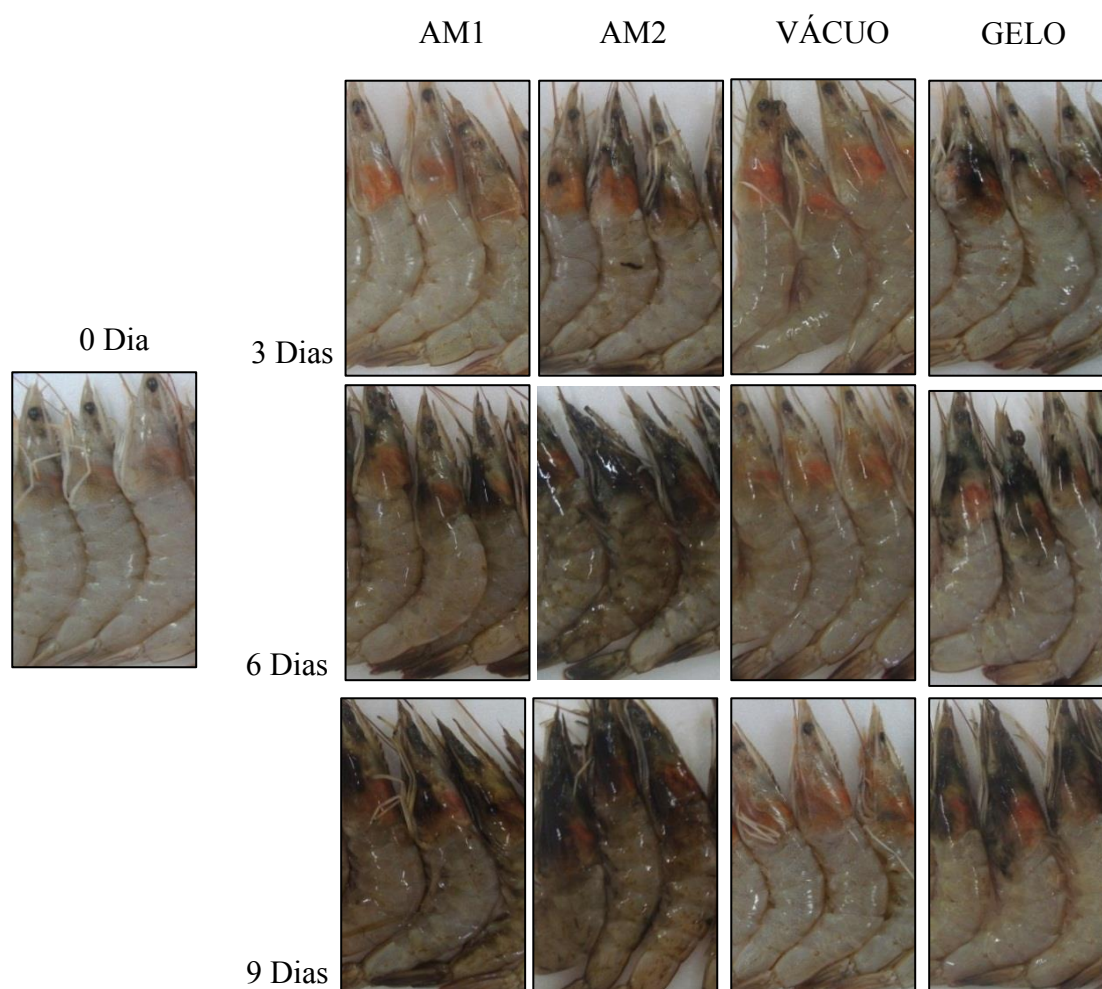


Figura 2 – Fotografia do camarão cultivado refrigerado sob diferentes atmosferas e em contato em gelo escama por um período de 9 dias. AM1: Atmosfera modificada contendo (75% CO<sub>2</sub> e 25% O<sub>2</sub>); AM2: Atmosfera modificada contendo (25% CO<sub>2</sub> e 75% O<sub>2</sub>).

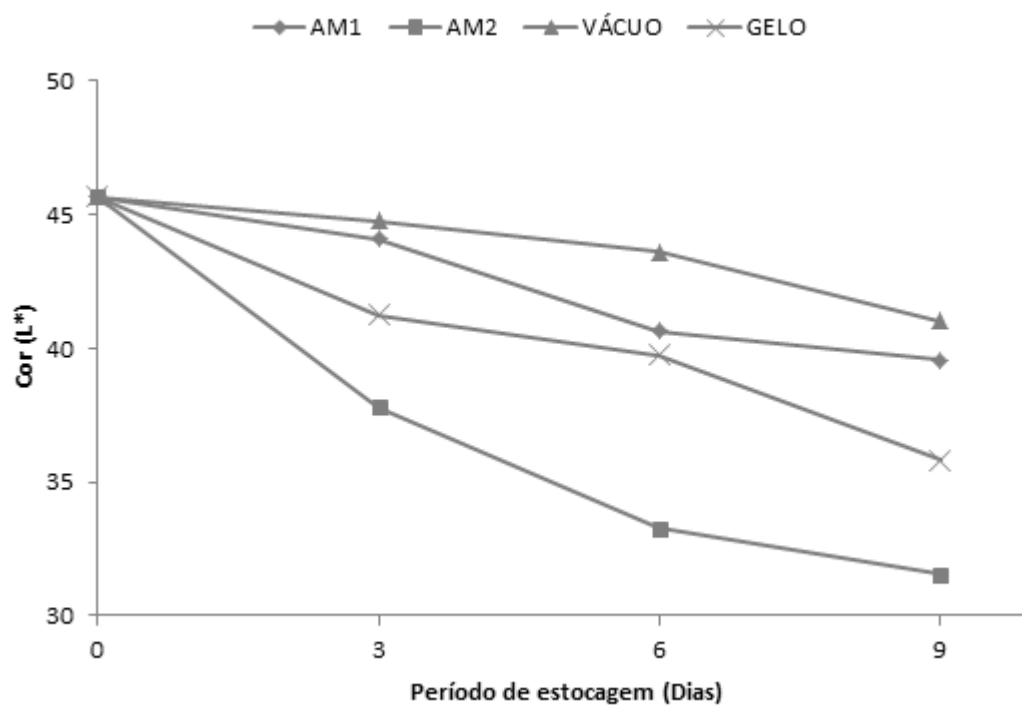


Figura 3 - Avaliação dos valores de L\* do camarão cultivado refrigerado sob diferentes atmosferas e em contato em gelo escama por um período de 9 dias. AM1: Atmosfera modificada contendo (75% CO<sub>2</sub> e 25% O<sub>2</sub>); AM2: Atmosfera modificada contendo (25% CO<sub>2</sub> e 75% O<sub>2</sub>).



Tabela 2 - Médias e desvio padrão dos parâmetros físico do camarão cultivado refrigerado sob diferentes atmosferas e em contato em gelo escama por um período de 9 dias.

PARÂMETRO	TRATAMENTO	PERÍODO DE ESTOCAGEM (DIAS)			
		0	3	6	9
pH	AM1	7,30±0,00 <sub>aA</sub>	7,25±0,10 <sub>aA</sub>	8,05±0,00 <sub>aB</sub>	8,25±0,30 <sub>aB</sub>
	AM2	7,30±0,00 <sub>aA</sub>	7,42±0,00 <sub>aA</sub>	7,94±0,00 <sub>aB</sub>	8,50±0,00 <sub>bC</sub>
	VÁCUO	7,30±0,00 <sub>aA</sub>	7,24±0,00 <sub>aA</sub>	7,69±0,20 <sub>bB</sub>	8,06±0,20 <sub>aB</sub>
	GELO	7,30±0,00 <sub>aA</sub>	7,25±0,10 <sub>aA</sub>	7,87±0,10 <sub>aB</sub>	8,52±0,00 <sub>bC</sub>
Aa	AM1	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>
	AM2	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>
	VÁCUO	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,98±0,00 <sub>bB</sub>	0,98±0,00 <sub>bB</sub>
	GELO	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>	0,99±0,00 <sub>aA</sub>
Textura (N)	AM1	9,69±0,60 <sub>aA</sub>	10,23±1,10 <sub>aA</sub>	10,28±1,70 <sub>aA</sub>	9,86±0,50 <sub>aA</sub>
	AM2	9,69±0,60 <sub>aA</sub>	11,53±1,14 <sub>aA</sub>	10,29±2,30 <sub>aA</sub>	9,99±0,60 <sub>aA</sub>
	VÁCUO	9,69±0,60 <sub>aA</sub>	12,02±2,00 <sub>aB</sub>	11,01±0,90 <sub>aBA</sub>	9,25±3,60 <sub>aA</sub>
	GELO	9,69±0,60 <sub>aA</sub>	11,18±0,20 <sub>aA</sub>	13,30±3,60 <sub>aB</sub>	9,28±9,28 <sub>aA</sub>

1 Letras diferentes na mesma coluna (a-b) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para tratamentos resfriados. 2 Letras diferentes na mesma linha (A-B) indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para tempo. AM1: Atmosfera modificada contendo (75% CO<sub>2</sub> e 25% O<sub>2</sub>); AM2: Atmosfera modificada contendo (25% CO<sub>2</sub> e 75% O<sub>2</sub>).

## **ANEXOS**

## Ficha 1 – Análise visual de melanose em camarão

Nome: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Muito obrigada pela participação nesta pesquisa. Você irá receber 2 amostras codificadas de camarão e compará-las com a escala ao lado. Atribua uma nota para cada um dos 10 camarões de cada amostra.

<b>Nota</b>	<b>Descrição</b>
1	Ausente
2	Leve a moderada (até 30% da superfície do corpo afetada).
3	Severo (30-70% da superfície do corpo afetada).
4	Extremamente severa (70-100% da superfície do corpo afetada)

<b>Amostra</b>	<b>Camarão</b>									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_