

ESTUDO PRELIMINAR SÔBRE A "BARRIGA PRETA" DAS LAGOSTAS ⁽¹⁾

Gustavo Hitzschky F. Vieira

Masayoshi Ogawa

Laboratório de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza — Ceará — Brasil

O aparecimento de manchas escuras em lagostas, fenômeno comumente denominado "barriga preta", provoca uma depreciação no produto. Isso ocorre após o descabeçamento, e as manchas localizam-se, inicialmente, na junção do cefalotórax com a cauda e, posteriormente, em toda a cauda.

Sabe-se que a ocorrência da mancha preta em camarões é proveniente da auto-oxidação de certos cromógenos do tipo amino-fenol, provávelmente oriundos da quebra de proteínas, resultando na formação de melaninas (Fieger, 1952), e que a reação oxidativa de tirosinase sobre tirosina, produzindo melanina, é acelerada por ions de cobre ou outros ions metabólicos (Bailey & Fieger, 1954).

Kakimoto & Kanazawa (1956b) estudaram a formação da mancha escura na lagosta *Panulirus japonicus* (V. Siebold), tomando por base a reação tirosina-tirosinase, constatando a formação de melanina.

O presente trabalho refere-se ao estudo das lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laevicauda* (Latreille), quanto à influência de tecidos e órgãos na formação da mancha escura, o efeito do pH sobre o referido fenômeno, atividade da reação tirosina-tirosinase e a possível ação inibidora de certos compostos químicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Trabalhamos com a parte ventral da carapaça da cauda, musculatura da cauda, he-

molinha, brânquias, estômago, intestino e hepatopâncreas das espécies mencionadas, incluindo indivíduos de ambos os sexos.

Na preparação das amostras seguimos o método usado por Kakimoto & Kanazawa (1956a, 1956b), com algumas modificações.

Para verificação de quais misturas de tecidos e órgãos produzem a mancha escura, preparamos extratos aquosos na proporção de 1:5 (material + água destilada). De cada extrato, tomamos várias amostras de 0,5g, sendo uma usada como testemunha e as outras misturadas com cada um dos demais extratos, além da preparação com L — tirosina. Em todas as amostras adicionamos 2 ml de tolueno, como conservante. As leituras foram feitas após 24 horas de permanência das amostras em estufa a 37°C. Os sinais (+) e (-) indicam o escurecimento e não escurecimento, respectivamente. A intensidade do escurecimento é referida pelo menor ou maior número de sinais.

Para o estudo da influência do pH, preparamos extratos de carapaça com água saturada de clorofórmio, na proporção de 1:10, tomando-se 1,5 ml do extrato para 16 ml de tampão McIlvaine e 20 mg de L — tirosina, com intervalos de pH entre 4 e 8.

A atividade da tirosinase foi examinada através da reação apresentada por 1 ml de cada uma das seguintes misturas: extrato de carapaça com água saturada de clorofórmio, na proporção de 1:10; hemolinfa com solução salina (0,85%), na proporção de 6:10. Em cada mistura adicionamos 32 ml de tampão McIlvaine e 25 mg de L — tirosina, com pH em torno de 7,5.

As misturas preparadas para o estudo da tirosinase, com vistas à ação de inibidores, foram testadas com os seguintes compostos químicos: ácido etileno-diamino-tetra-acético

(1) — Trabalho concluído durante a vigência do convênio com o Banco do Nordeste do Brasil, para o desenvolvimento de pesquisas sobre a tecnologia do pescado.

(EDTA), nas concentrações de 0,1% e 1,0% ; bisulfito de sódio a 0,01% e 0,1% ; e 1 ml de cisteína a 0,001 M. Em tôdas as preparações adicionamos 2 ml de tolueno.

As misturas destinadas a medir a atividade da reação tirosina-tirosinase foram examinadas após 4, 8, 12 e 24 horas de permanência em estufa a 37°C. As colorações apresentadas foram medidas em espectrofotômetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb), com comprimento de onda de 400, 430, 500, 570 e 660 m μ , isto com relação ao pH e à atividade da tirosinase. Para a ação de inibidores, os resultados foram expressos pelos sinais (+) e (-), de significação já indicada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pela mistura de extratos dos tecidos ou órgãos entre si e L — ti-

rosina são apresentados nas tabelas I e II. Referem-se somente às fêmeas de ambas espécies, uma vez que, em ensaio prévio, não notamos diferenças entre sexos. As misturas carapaça + L — tirosina e hemolinfa + L — tirosina foram as que se apresentaram com escurecimento mais intenso. Os dados para ambas as espécies apresentaram-se semelhantes, sendo notada apenas uma diferença, registrada na mistura hepatopâncreas + L — tirosina.

Os dados encontrados para a densidade ótica, nos comprimentos de onda utilizados, mostram que os valores de pH entre 6 e 8 constituem o intervalo ótimo para a reação carapaça + L — tirosina, havendo inibição da mesma, com pH abaixo de 6 (tabela III, figura 1). Kakimoto & Kanazawa (1956a), encontraram este mesmo intervalo ótimo, tra-

TABELA I

Dados relativos ao escurecimento, em misturas de tecidos e órgãos da lagosta *Panulirus argus* (Latreille).

Tecidos e órgãos	Cara- paça	Músculo	Hemo- linfa	Brân- quias	Estô- mago	Intes- tino	Hepato- pâncreas	L — tiro- sina
carapaça	—	—	—	+	—	+	—	+++
músculo	—	—	—	—	—	—	—	—
hemolinfa	—	—	—	—	—	—	+	++++
brânquias	+	—	—	—	—	—	—	++
estômago	—	—	—	—	—	—	—	+
intestino	+	—	—	—	—	—	—	+
hepatopâncreas	—	—	+	—	—	—	—	—

TABELA II

Dados relativos ao escurecimento, em misturas de tecidos e órgãos da lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille).

Tecidos e órgãos	Cara- paça	Músculo	Hemo- linfa	Brân- quias	Estô- mago	Intes- tino	Hepato- pâncreas	L — tiro- sina
carapaça	—	—	—	++	—	+	—	++++
músculo	—	—	—	—	—	—	—	—
hemolinfa	—	—	—	—	—	—	++	+++
brânquias	++	—	—	—	—	—	—	++
estômago	—	—	—	—	—	—	—	+
intestino	+	—	—	—	—	—	—	++
hepatopâncreas	—	—	++	—	—	—	—	+

TABELA III

Influência do pH sobre a reação entre extrato da carapaça + L — tirosina, nas lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laeviscauda* (Latreille).

pH inicial	Densidade ótica									
	<i>Panulirus argus</i>					<i>Panulirus laeviscauda</i>				
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,070	0,012	0,011	0,010	0,008
5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,310	0,278	0,230	0,185	0,155
6	0,265	0,235	0,210	0,170	0,145	0,640	0,560	0,520	0,480	0,400
7	0,470	0,420	0,400	0,385	0,325	0,610	0,535	0,470	0,435	0,360
8	0,570	0,500	0,455	0,440	0,355					
Comp. de onda (m μ)	400	430	500	570	660	400	430	500	570	660

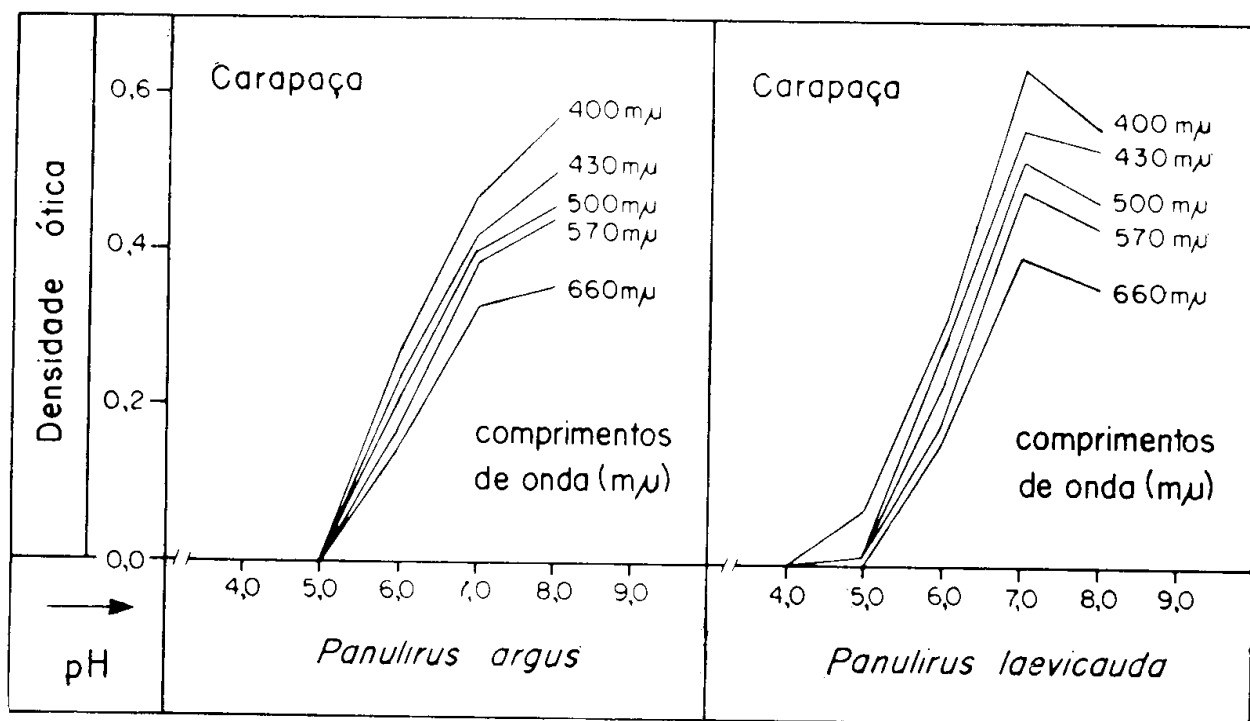


Figura 1 — Influência do pH sobre a densidade ótica, na reação entre extrato da carapaça + L-tirosina, em diversos comprimentos de onda, nas lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laeviscauda* (Latreille).

TABELA IV

Atividade da tirosinase, através das reações entre extrato da carapaça + L — tirosina e hemolinfa + L — tirosina, na lagosta *Panulirus argus* (Latreille).

Comp. de onda (m μ)	Densidade ótica							
	carapaça + L-tirosina				hemolinfa + L-tirosina			
400	0,110	0,530	0,980	1,800	0,180	0,620	1,700	> 2,000
430	0,085	0,460	0,860	1,600	0,170	0,560	1,500	> 2,000
500	0,060	0,410	0,760	1,400	0,165	0,515	1,250	> 2,000
570	0,042	0,385	0,700	1,250	0,160	0,490	1,200	1,800
660	0,040	0,320	0,590	0,950	0,120	0,420	0,940	1,300
Horas	4	8	12	24	4	8	12	24

TABELA V

Atividade da tirosinase, através das reações entre extrato da carapaça + L — tirosina e hemolinfa + L — tirosina, na lagosta *Panulirus laeviscauda* (Latreille).

Comp. de onda (m μ)	Densidade ótica							
	carapaça + L-tirosina				hemolinfa + L-tirosina			
400	0,490	1,150	1,700	> 2,000	0,165	0,375	0,780	1,700
430	0,420	0,975	1,400	> 2,000	0,145	0,330	0,700	1,490
500	0,390	0,875	1,250	> 2,000	0,140	0,310	0,625	1,350
570	0,385	0,820	1,200	1,900	0,135	0,290	0,570	1,160
660	0,325	0,665	0,950	1,400	0,120	0,255	0,475	0,850
Horas	4	8	12	24	4	8	12	24

balhando com a mistura hemolinfa + hepa-
topâncreas da lagosta *Panulirus japonicus*.

A formação de melanina depende de três
substâncias disponíveis: substrato favorável
— usualmente tirosina ou dihidroxifenilami-

na, oxigênio molecular e enzima tirosinase —
um complexo cobre-proteína (Lerner & Fitz-
patrick, 1950).

A atividade da reação tirosina-tirosinase,
medida pela densidade ótica, na mistura he-

molinfa + L — tirosina foi mais acentuada na espécie *Panulirus argus* do que em *Panulirus laevicauda*, o contrário acontecendo na

mistura carapaça + L — tirosina (tabelas IV e V, figura 2).

Nestas espécies, é possível admitir que a

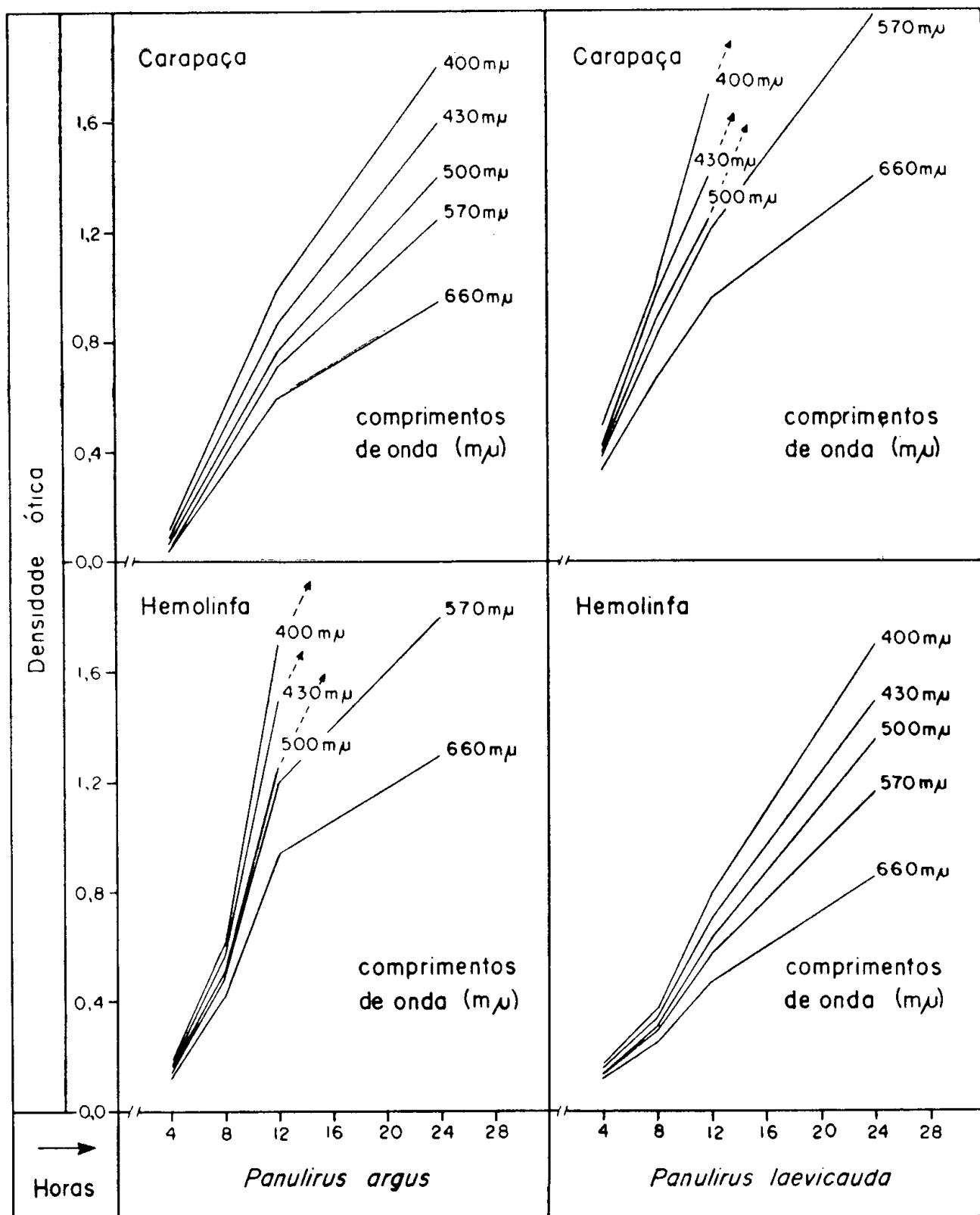


Figura 2 — Atividade da tirosinase, através da densidade ótica, nas reações entre extrato da carapaça + L-tirosina e hemolinfa + L-tirosina, em diversos comprimentos de onda e intervalos de tempo, nas lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laevicauda* (Latreille).

TABELA VI

Ação de inibidores sobre o escurecimento, nas reações extrato de carapaça + L — tirosina e hemolinfa + L — tirosina, nas lagostas *Panulirus argus* (Latreille) e *Panulirus laevicauda* (Latreille).

Misturas	Inibidores				
	EDTA 1,0%	EDTA 0,1%	NaHSO ₃ 0,1%	NaHSO ₃ 0,01%	cisteína 0,001 M
carapaça + L — tirosina	—	+	—	—	+
hemolinfa + L — tirosina	—	+	—	—	+

enzima tirosinase esteja em maior proporção na hemolinfa de *Panulirus argus*. Por outro lado, podemos desprezar a presença de tirosina livre na hemolinfa (que poderia somar-se ao substrato usado), uma vez que Kakimoto & Kanazawa (1956b) não encontraram este aminoácido livre na hemolinfa da lagosta *Panulirus japonicus*.

A maior atividade da reação carapaça + L — tirosina, verificada na lagosta *Panulirus laevicauda*, sugere uma maior concentração de tirosina e maior atividade da tirosinase na carapaça desta espécie, entre outros fatores influentes.

Dos compostos químicos usados para evitar o aparecimento de coloração escura, proveniente das misturas carapaça + L — tirosina e hemolinfa + L — tirosina, o mais eficiente foi o bisulfito de sódio; o EDTA na concentração 1,0% foi capaz de impedir o escurecimento, o mesmo não ocorrendo na concentração 0,1% ; a cisteína a 0,001 M também não inibiu o escurecimento (tabela VI).

Bailey & Fieger (1954) inibiram o escurecimento do camarão pelo uso de sulfito de sódio e admitiram que este composto, combinando-se com o cobre da enzima em condições favoráveis, inibe a formação de melanina.

É provável que o cobre contido na hemolinfa das lagostas favoreça a reação de escurecimento e o uso de sulfitos, como sulfito ou bisulfito de sódio, bloqueie o cobre do sistema, com conseqüente prejuízo para a reação enzimática substrato.

CONCLUSÕES

1 — A coloração escura apareceu mais intensamente nas misturas extrato da carapaça + L — tirosina e hemolinfa + L — tirosina, nas duas espécies estudadas.

2 — Os valores de pH entre 6 e 8 foram os mais favoráveis ao aparecimento da coloração escura, na mistura extrato da carapaça + L — tirosina, em ambas as espécies.

3 — A atividade da reação tirosina-tirosinase foi mais acentuada na espécie *Panulirus argus*, na mistura hemolinfa + L — tirosina.

4 — A atividade da reação tirosina-tirosinase foi mais acentuada na espécie *Panulirus*

laevicauda, na mistura extrato da carapaça + L — tirosina.

5 — O bisulfito de sódio nas concentrações 0,01% e 0,1% e o EDTA na concentração de 1,0% , inibiram a formação de coloração escura, o mesmo não acontecendo com o EDTA a 0,1% e a cisteína a 0,001 M.

SUMMARY

In this paper the authors study some conditions related to the appearance of darkening in tissues and organs of the spiny lobsters *Panulirus argus* (Latreille) and *Panulirus laevicauda* (Latreille).

We prepared water extracts of several tissues and organs and mixed them with one another and with L — tyrosine. The darkening was found to be more intense in the mixtures of tail shell extract + L — tyrosine and hemolymph + L — tyrosine, for both species.

The pH values from 6 to 8 were most favourable to the appearance of darkening, as a result of the reaction between the tail shell extract + L — tyrosine, in both species.

Activity of the tyrosine was higher for the species *Panulirus argus* in the hemolymph + L — tyrosine reaction, and higher for the species *Panulirus laevicauda* in tail shell extract + L — tyrosine.

Sodium hydrogen sulfite at 0.01% and 0.1% concentrations proved to be the most efficient inhibitor of the darkening, followed by the ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) at 1.0% concentration. The EDTA at 0.1% and cysteine 0.001 M did not present an inhibitory function in the cited reaction.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bailey, M. E. & Fieger, E. A. — 1954 — Chemical Prevention of Black Spot (Melanogenesis) in Ice Stored Shrimp. *Food Technology*, Chicago, VIII (7) : 317-319, 3 figs.

Fieger, E. A. — 1952 — Studies on Black Spotted Shrimp. *Proc. Gulf Caribb. Fish. Inst., 4th Ann. Session*, Miami, pp. 79-82 (bibliografia original não consultada).

Kakimoto, D. & Kanazawa, A. — 1956a — Studies on the Black Discoloration of Lobster — I. Origin of Discoloration. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, 22 (8) : 471-475, 1 fig. (em japonês).

Kakimoto, D. & Kanazawa, A. — 1956b —

Studies on the Black Discoloration of Lobster — II. Relation between Tyrosinase and Black Discoloration. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, 22 (8) : 476-479, 1 fig. (em japonês).

Lerner, A. B. & Fitzpatrick, T. B. — 1950 — Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.*, Washington, 30 : 91-126 (bibliografia original não consultada).