

Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola

COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO  
DAS BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS (BNV) EM PESCADO :  
PARÂMETROS CRÍTICOS E MODIFICAÇÕES

ARNALDO YOSHITERU KUAYE

Prof. Dr. EMILIO SEGUNDO CONTRERAS GUZMÁN  
Orientador

Tese apresentada à  
Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola para obtenção  
do Título de Mestre

Campinas - São Paulo  
- 1982 -

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

# Í N D I C E

	Página
Índice de Quadros .....	<i>i</i>
Índice de Figuras .....	<i>iv</i>
Resumo .....	<i>v</i>
Summary .....	<i>vii</i>
I. INTRODUÇÃO .....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
A. Deterioração do pescado .....	3
1. Rigor-mortis .....	4
2. Ação bacteriana .....	6
3. Degradação proteolítica .....	7
B. Bases nitrogenadas voláteis (BNV) .....	9
1. Amônia .....	10
a. Degradação do ATP .....	11
b. Hidrólise da uréia .....	12
c. Degradação de aminoácidos .....	13
2. Trimetilamina .....	15
3. Dimetilamina .....	16
C. Determinação de BNV como teste de frescor .....	17
1. Métodos para determinação de BNV .....	18
2. Variações dos métodos analíticos .....	20

III. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
A. Materiais .....	22
1. Matéria-prima .....	22
2. Reagentes .....	23
3. Equipamentos .....	23
B. Métodos .....	25
1. Preparo dos reagentes .....	25
a. Solução de ácido tricloroacético .....	25
b. Soluções de ácido sulfúrico-sulfato de sódio .....	25
c. Solução de ácido bórico com indicador ...	25
d. Solução saturada de Borax .....	25
e. Solução de hidróxido de sódio .....	27
f. Solução de Carbonato de sódio .....	27
g. Solução de cloreto de amônio .....	27
h. Solução de hidrocloreto de trimetilamina.	27
i. Solução de uréia .....	27
j. Solução de ácido clorídrico .....	27
2. Preparo das amostras para determinação de BNV	28
a. Homogeneização da amostra .....	28
b. Preparo dos extratos .....	28
3. Determinação de BNV .....	29
a. Método de Lucke & Geidel .....	30
b. Método do IFOP .....	31
c. Método do IFOP modificado .....	32

	Página
4. Ensaio comparativos entre o método de Lucke & Geidel e do IFOP .....	33
a. Influência do tempo de destilação e do volume destilado .....	33
b. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica .....	33
5. Estudos para modificação do método do IFOP	34
a. Substituição de ácido tricloroacético por ácido sulfúrico-sulfato de sódio ...	34
b. Substituição de óxido de magnésio por Borax .....	34
c. Substituição de óxido de magnésio por outros agentes alcalinizantes .....	35
d. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica .....	35
6. Avaliação da hidrólise da uréia e de sua contribuição no teor de BNV .....	36
a. Hidrólise da uréia em soluções puras ...	36
b. Hidrólise da uréia na mistura de soluções padrões com extratos de músculo de cação	36
7. Determinação de BNV em pescados estocados em gelo .....	37
a. Preparo do pescado para conservação em gelo .....	37
b. Retirada de amostras .....	38

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Ensaio comparativos entre o método de Lucke & Geidel e do IFOP .....	39
1. Influência do tempo de destilação e do volume de destilado .....	39
2. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica .....	44
B. Estudos para modificação do método do IFOP ....	47
1. Substituição de ácido tricloroacético pela solução de ácido sulfúrico-sulfato de sódio	47
2. Substituição de óxido de magnésio por Borax	49
3. Substituição de óxido de magnésio por outros agentes alcalinizantes .....	50
4. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica .....	54
C. Avaliação da hidrólise da uréia e de sua contribuição no teor de BNV .....	56
1. Hidrólise da uréia em soluções puras .....	57
2. Hidrólise da uréia na mistura de soluções padrões com os extratos de cação .....	59
D. Avaliação comparativa dos três métodos para determinação de BNV em pescado estocado em gelo .	62
1. Pescado marinho .....	62
a. Sardinha em filês .....	62
b. Sardinha inteira .....	69
c. Cação em postas .....	73

	Página
2. Pescado de água doce .....	77
a. Tilápia .....	77
b. Curimatã eviscerado .....	82
V. CONCLUSÕES .....	86
VI. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS .....	88
VII. BIBLIOGRAFIA .....	89

## ÍNDICE DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Quantidade de $H_2SO_4$ concentrado e $Na_2SO_4$ anidro necessária para preparação de 1.000 mL de solução .....	26
QUADRO 2 - Evolução de BNV, em músculo de sardinha, em função do tempo de destilação e volume destilado .....	40
QUADRO 3 - Avaliação da reprodutibilidade analítica do método de Lucke & Geidel e IFOP .....	45
QUADRO 4 - Análise de variância entre os métodos de Lucke & Geidel e IFOP .....	46
QUADRO 5 - Determinação de BNV em extratos de sardinha preparados com solução de ácido tricloroacético e solução de ácido sulfúrico-sulfato de sódio .....	48
QUADRO 6 - Recuperação de nitrogênio volátil (NV) proveniente da destilação de $(CH_3)_3N.HCl$ e $NH_4Cl$ e, de extratos de sardinha .....	51
QUADRO 7 - Influência do meio alcalino na destilação de BNV em extratos e músculo de sardinha .....	52

QUADRO 8 - Avaliação da reprodutibilidade analítica do método do IFOP e IFOP modificado, empregados na determinação de BNV em músculo de sardinha .....	55
QUADRO 9 - Análise de variância entre o método do IFOP e IFOP modificado .....	56
QUADRO 10- Determinação de nitrogênio amoniacal proveniente da hidrólise da uréia em soluções puras, pelo efeito da destilação em meios alcalinos .....	58
QUADRO 11- Porcentagem de uréia hidrolisada durante a destilação em meios alcalinos .....	58
QUADRO 12- Influência da adição de uréia no valor de BNV em extratos de cação ( $C_1$ e $C_2$ ) destilados com diversos alcalinizantes ....	60
QUADRO 13- Porcentagem de aumento de BNV pela adição de uréia na alíquota do pescado destilado .....	60
QUADRO 14- Determinação de BNV em filês de sardinha estocados em gelo .....	63
QUADRO 15- Diferenças nos teores de BNV determinados, em filês de sardinha estocados em gelo pelos três métodos .....	67

QUADRO 16- Determinação de BNV em sardinha inteira estocada em gelo .....	70
QUADRO 17- Determinação de BNV em postas de cação <u>es</u> tocadas em gelo .....	74
QUADRO 18- Determinação de BNV em tilápias estocadas em gelo .....	78
QUADRO 19- Determinação de BNV em curimatã eviscerado estocado em gelo .....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Esquema do aparelho de destilação para determinação de BNV .....	24
FIGURA 2 - Evolução de BNV em músculo da sardinha em função do tempo de destilação .....	41
FIGURA 3 - Evolução de BNV em músculo de sardinha em função do volume destilado .....	43
FIGURA 4 - Relação de BNV e o pH empregado na destilação de extratos de sardinha .....	53
FIGURA 5 - Evolução de BNV em filés de sardinha ao longo da estocagem em gelo .....	64
FIGURA 6 - Evolução de BNV em sardinha ao longo da estocagem em gelo .....	71
FIGURA 7 - Evolução de BNV em postas de cação ao longo da estocagem em gelo .....	75
FIGURA 8 - Evolução de BNV em tilápia ao longo de estocagem em gelo .....	79
FIGURA 9 - Evolução de BNV em cùrimbatã eviscerado ao longo da estocagem em gelo .....	84

## RESUMO

Este trabalho tratou do estudo dos métodos mais comuns para determinação das bases nitrogenadas voláteis (BNV) em pescado, mediante ensaios de comparação quanto aos teores de BNV em diferentes espécies de peixes, avaliados pelo método de Lucke & Geidel, do Instituto de Fomento Pesqueiro do Chile (IFOP) e IFOP- modificado neste trabalho. Paralelamente, foi investigada a contribuição da hidrólise da uréia, provocada pela etapa de destilação do procedimento analítico, nos teores de BNV em músculo de cação.

Foi verificado que os teores de BNV variam conforme a metodologia, a espécie de pescado e o estágio de deterioração.

Nos ensaios comparativos dos três métodos para determinação de BNV em diferentes espécies, ao longo da estocagem em gelo, o emprego do método de Lucke & Geidel proporcionou a obtenção de níveis de BNV sempre superiores àqueles obtidos com os dois outros métodos.

Verificou-se que as bases nitrogenadas voláteis, com o método de Lucke & Geidel, continuavam a ser extraídas do músculo mesmo após 25 minutos de destilação enquanto que, com o método do IFOP, com precipitação preliminar das proteínas, as bases eram destiladas totalmente do extrato de sardinha nos primeiros 5 minutos.

As modificações no método do IFOP, com a substituição de ácido tricloroacético por ácido sulfúrico-sulfato de

sódio e de óxido de magnésio por Borax, proporcionaram a quantificação de teores de BNV 10% superiores aos do método original, principalmente devido a substituição do ácido tricloroacético.

Nos ensaios com soluções puras de uréia e na mistura com extratos de cação a contribuição em nitrogênio amoniacol, proveniente da hidrólise da uréia durante a análise, alcançou níveis de até 49,70% do total das bases nitrogenadas voláteis dos extratos de músculo de cação.

No experimento com filês de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) estocados em gelo, os teores iniciais de BNV, obtidos com os métodos de Lucke & Geidel, IFOP e IFOP-modificado, foram de 15,37 , 8,46 e 9,98 mg, respectivamente. Essas diferenças diminuíram com o avanço da deterioração chegando quase a se anular após 30 dias de estocagem. Comportamento semelhante foi observado nos ensaios relativos a sardinha inteira e tilápia (*Tilapia* sp.).

De uma maneira geral a evolução de BNV, em postas de cação, em função do tempo de estocagem em gelo, mostrou um comportamento exponencial. Pelo método de Lucke & Geidel os valores de BNV foram de 54,14mg, no 1º dia, e 361,42 mg no 11º dia.

Em peixes de água doce, tilápia e curimatã (*Prochilodus* sp.) a evolução de BNV procedeu de forma lenta durante a estocagem. Pelo método de Lucke & Geidel, os teores de BNV para a tilápia foram de 21,32 mg, no 1º dia, contra 32,56 mg no 21º dia e para o curimatã de 18,52 mg, no 1º dia, e 20,65 mg , no 11º dia.

## SUMMARY

The objective of this work was to investigate and compare the methods of Lucke & Geidel, Instituto de Fomento Pesqueiro do Chile (IFOP) and IFOP modified in this study for determination of volatile nitrogen bases (VNB) in different species of fish. At the same time, it was studied the effect of hydrolysis of urea, caused by the distillation step, on the VNB value of dogfish flesh.

It was shown that the VNB values were dependent on the methodology used for analysis, species of fish and storage time on ice.

Comparison among the three methods revealed, regardless of the species, that the method of Lucke & Geidel gave higher VNB values than both the IFOP and the modified IFOP.

Studies on the evolution of volatile nitrogen bases by the method of Lucke & Geidel showed that these compounds continued to be distilled after 25 minutes of distillation. When the IFOP method was used, with previous protein precipitation, the VNB were completely distilled after 5 minutes.

In the IFOP method, the substitution of trichloroacetic acid by sulfuric acid (2,5%)-sodium sulphate (7,5%) and magnesium oxide by a saturated solution of Borax caused an increase of 10% in the VNB values. This increase was mainly due to TCA replacement.

Model studies with pure urea solution and mixture of this solution with dogfish extracts revealed that the hydrolysis of urea during the procedure contributed up to 49,70% of the total VNB of the extract. This hydrolysis was caused by distillation in alkaline medium.

The initial values of VNB in sardine (*Sardinella brasiliensis*) fillets stored on ice, determined by the Lucke & Geidel, IFOP and modified IFOP methods, were 15,37 mg, 8,46 mg and 9,98 mg, respectively. These differences decreased with time and were not significant after 30 days of storage. This behaviour was similar for whole sardines and tilapia (*Tilapia* sp.).

Regardless of the method, during the storage on ice the production VNB of dogfish slices increased in an exponential manner. The Lucke & Geidel method gave values of VNB of 54,14 mg and 361,42 in the 1<sup>st</sup> and 11<sup>th</sup> days of storage, respectively.

In freshwater fish, tilapia and curimatã (*Prochilodus* sp.) the production of VNB during the storage on ice increased slowly. The Lucke & Geidel method gave values of VNB, for tilapia, of 21,32 mg and 32,56 mg in the 1<sup>st</sup> and 21<sup>st</sup> day of storage, respectively. The VNB values, for curimatã, in the 1<sup>st</sup> and 11<sup>th</sup> day of storage were 18,52 mg and 20,65 mg, respectively.

## I. INTRODUÇÃO

O julgamento da qualidade ou o estabelecimento de índices de frescor de pescado tem merecido, por parte dos pesquisadores em todo mundo, uma atenção especial no sentido de desenvolver ou aprimorar métodos que possam melhor avaliar o grau de deterioração. Ainda não foi encontrado um método de avaliação química ou física que possa, por si só, definir a condição do material. Há sempre a necessidade de uma correlação com ensaios organolépticos, que por sua vez estão sujeitos a impressões subjetivas por parte do elemento qualificador.

Um dos métodos químicos que mais tem sido utilizado na avaliação do grau de frescor de pescado está relacionado com a determinação de bases voláteis provenientes da decomposição de compostos nitrogenados, por ação de enzimas autolíticas e microbianas. Estas bases, constituídas principalmente por amônia e trimetilamina, aumentam progressivamente com a deterioração, sendo determinadas no tecido muscular sob a forma de bases nitrogenadas voláteis (BNV).

A determinação de BNV em pescado, embora seja largamente utilizada, causa ainda controvérsia entre os pesquisadores no sentido de se estabelecer limites superiores para o julgamento da condição de "aceitável/inaceitável" dos produtos marinhos consumidos pela população e da própria vali

dade dessa determinação como indicador do grau de frescor em diferentes espécies. Contudo, o método tem sido oficializado em vários países por se tratar de um método rápido, simples e ao alcance de qualquer laboratório de controle de qualidade.

Existe o convencimento de que a determinação analítica das bases nitrogenadas voláteis pode ser aprimorada para garantir que as bases tituladas correspondam verdadeiramente aos compostos gerados pela deterioração do pescado e não aos artifícios do método analítico. Até hoje porém, não foram publicadas pesquisas no sentido de se avaliar a influência dos diversos parâmetros analíticos na exatidão da determinação, nem tampouco foram avaliadas de forma comparativa as diversas modificações propostas para essa finalidade.

A presente pesquisa teve como objetivo:

- a) Comparar o método convencional de Lucke & Geidel com o proposto pelo Instituto de Fomento Pesqueiro do Chile (IFOP), quanto à influência do tempo de destilação, volume destilado e reprodutibilidade analítica .
- b) Propor modificações para o método do IFOP, visando a substituição de ácido tricloroacético e óxido de magnésio que são reagentes relativamente caros.
- c) Verificar a ocorrência da hidrólise da uréia durante o teste e avaliar a contribuição da amônia resultante no teor de BNV.
- d) Comparar os métodos de Lucke & Geidel, IFOP e o método modificado nesta pesquisa, em ensaios de preservação de pescado de origem marinha e de água doce, mantidos em gelo.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### A. DETERIORAÇÃO DO PESCADO

Dentre os produtos de origem animal utilizados na alimentação humana, o pescado é o mais susceptível às alterações provocadas por enzimas autolíticas e ação microbiana. O grau de alteração, no transcorrer do processo deteriorativo, está intimamente vinculado a diversos fatores como : espécie, estágio de maturação, sazonalidade, microflora natural, condições de captura, processamento e estocagem.

O pescado, após a morte, continua a sofrer uma série de modificações químicas, físicas e microbiológicas que resultam na deterioração do mesmo. A evolução do processo de deteriorativo ao longo da estocagem em gelo é caracterizado principalmente pelo estado de *rigor mortis*, ação bacteriana e degradação proteolítica .

LUDORF & MEYER (1973) relataram que o tempo de rigidez é decisivo para a capacidade de conservação do pescado, já que em seu curso interrompem-se os fenômenos enzimáticos e bacterianos responsáveis pela decomposição do tecido muscular, sendo que a rigidez bloqueia por completo a permeabilidade das células para a troca de substâncias. Segundo os mesmos autores, após a rigidez, inicia-se o desdobramento dos derivados purínicos da adenosina trifosfato (ATP) por desami

nação com a formação de amônia e, simultaneamente, os micro organismos podem desdobrar os aminoácidos livres formando amônia. Apõs estas etapas acontece a proteõlise propriamente dita, com a decomposição do alimento.

A fração lipídica do músculo de pescado, sob condições de refrigeração, raramente exhibe alguma tendência a sofrer rancificação e hidrõlise enzimática (LISTON *et alii*, 1963). Os metabõlitos da degradação desta fração sõ sãõ perceptíveis num estãgio mais avançado da deterioração, quando a contaminação bacteriana já tornou o produto imprõprio para o consumo (LUDORF & MEYER, 1973). Isto indica uma provãvel competição das bactõrias pelo oxigênio dos substratos (MARTIN *et alii*, 1978).

### 1. Rigor-mortis

Tem sido proposto que o decrêscimo de adenosina trifosfato (ATP) em músculo de pescado é a principal condição para o estabelecimento do estado de *rigor mortis*. O início do rigor pode ser retardado pela diminuição do esforço durante a captura, manuseio apropriado do pescado e rãpido abaixamento da temperatura do pescado apõs a morte (ZAITSEV *et alii*, 1969).

O início e a duração do *rigor-mortis* pode variar significativamente em diferentes espécies, dentro das mesmas espécies e ainda em diferentes músculos da mesma espécie. Em peixes como bacalhau, pescada, merluza e linguado armazenados em gelo, o rigor pode começar de 1 a 3 horas após a morte e pode terminar num período de 1 a 3 dias de acordo com a temperatura, estado de nutrição, método de captura, etc (PEDRAJA, 1972).

A glucogenólise que se produz após a morte, com o conseqüente decréscimo de pH, é pequena em pescado, ao contrário do que sucede nos animais de abate. Atinge-se, desta maneira, valores de pH 6,2 e raras vezes, de 5,4 (LUDORF & MEYER, 1973).

Em geral, enquanto avança a deterioração bacteriana, há um acúmulo de produtos de natureza básica, tais como : trimetilamina, dimetilamina, amônia e algumas bases orgânicas, por isso, os valores de pH dos músculos de pescado aumentam de forma lenta no início e rapidamente no final da deterioração (TOMIYASU & ZENITANI, 1957). Um crescimento bacteriano ótimo ocorre entre pH 6,5 e 7,5 (MARTIN *et alii*, 1978).

O estado de *rigor-mortis* parece dificultar a ação bacteriana provavelmente pela própria rigidez do músculo, portanto, um maior período de rigor é desejável do ponto de vista da qualidade microbiológica e para se conseguir esse objetivo devem ser empregados métodos apropriados de captura, manuseio e estocagem (PEDRAJA, 1972).

## 2. Ação bacteriana

Após a morte do pescado (ou outro animal), a defesa humoral contra a invasão bacteriana para de operar e as barreiras mecânicas, tais como pele e membranas, gradualmente perdem sua impermeabilidade (LISTON *et alii*, 1963) e 3 a 5 dias é uma estimativa razoável para a penetração das bactérias da pele para o músculo (MARTIN *et alii*, 1978).

As bactérias que com maior frequência participam da alteração do pescado são aquelas localizadas na mucosa que recobre a superfície externa do corpo e as do trato intestinal. Predominam espécies de *Pseudomonas* e as seguem em importância alguns membros dos gêneros *Achromobacter* e *Flavobacterium*. Menos frequentemente são encontradas *Micrococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Sarcina*, *Serratia* e *Clostridium*. O sabor de terra ou mofo que o pescado às vezes apresenta é atribuído ao crescimento de *Streptomyces* no fundo da água e à absorção de seu odor característico pelo pescado (FRAZIER, 1976).

No transcorrer do *rigor-mortis* há uma pequena mudança no número de bactérias presentes, a chamada fase "lag", que é seguida por um período de crescimento gradual, associado com mudanças organolépticas no pescado. A seguir, a população bacteriana entra numa fase mais ou menos exponencial, fase "log" de crescimento, correspondendo ao início da aparição

de substâncias indicadoras da putrefação. Essa fase é de curta duração e é sucedida por uma fase terminal, mais ou menos estacionária, do crescimento bacteriano na qual é pequena a mudança no número de populações bacterianas (LISTON *et alii*, 1963). Segundo MARTIN *et alii* (1978), a fase "lag" pode variar de 1 dia em pescado à temperatura ambiente até 4 a 5 dias sob estocagem em gelo .

Os primeiros nutrientes utilizados pelos microorganismos, no músculo de pescado, são os compostos nitrogenados não protéicos (NNP) e após esgotar esses substratos as proteases microbianas produzidas pelos microorganismos geram oligopeptídeos e aminoácidos livres como nova fonte de suprimento para o seu desenvolvimento (LUDORF & MEYER, 1973; LASZLO, 1975). Alguns metabólitos da atuação microbiana são: amônia, sulfeto de hidrogênio, dióxido de carbono, indol, mercaptanas, aminas (trimetilamina, cadaverina, putrescina), ácidos graxos inferiores e aldeídos (FRAZIER, 1976) .

### 3. Degradação proteolítica

A atuação enzimática sobre as proteínas do tecido muscular de pescado tem sido considerada como um dos fatores que causam a rápida deterioração após a captura.

O baixo nível de tecido conectivo em pescado (2 a 3% em teleosteos e cerca de 10% em cartilaginosos), embora vantajoso do ponto de vista da digestibilidade, torna o músculo menos protegido do ataque enzimático quando da ruptura celular durante a estocagem ou do processamento (PEDRAJA, 1972). O tecido conectivo do pescado fornece uma fraca proteção, visto que falta nele a resistente elastina e o colageno por sua vez é um excelente meio para a proliferação bacteriana (LU DORF & MEYER, 1973).

O tecido muscular do pescado possui catepsinas muito ativas, bem como peptidases. Por sua vez, a tripsina dos intestinos pode atravessar a parede abdominal e atingir os tecidos musculares. Estas enzimas podem gerar aminoácidos e pep tídeos que podem servir de substrato para o desenvolvimento de microorganismos (SIEBERT, 1962).

A ação de enzimas autolíticas em músculo de camarão produz um aumento da atividade das enzimas bacterianas, visto que estas não são capazes de atacar proteínas nativas. As enzimas proteolíticas presentes no músculo assumem, então, um papel importante na deterioração pois constituem-se no primeiro elo da degradação de macromoléculas a polipeptídeos, os quais são posteriormente hidrolisados a aminoácidos livres que enriquecem o substrato natural e ficam assim disponíveis para o crescimento dos microorganismos (PEDRAJA, 1970).

Na fase inicial do processo de deterioração há pouca atividade proteolítica por parte dos microorganismos,

que utilizam os compostos mais simples, com produção de bases (amônia e trimetilamina) e ácidos voláteis (LEITÃO, 1977). A atividade proteolítica de enzimas microbianas tem lugar numa etapa posterior, primariamente como um meio de reposição de aminoácidos no substrato (TOMIYASU & ZENITANI, 1957).

A quantidade de aminoácidos livres aumenta progressivamente durante os primeiros estágios após a captura e estocagem em gelo, como resultado da hidrólise autolítica das proteínas nativas e polipeptídeos. Entretanto, após alcançar um pico, o conteúdo de aminoácidos livres torna a decrescer notando-se um aumento correspondente de amônia. Posteriormente, há um aumento tanto em amônia quanto em aminoácidos, presumivelmente causado pelo aumento da hidrólise protéica devido à ação bacteriana (PEDRAJA, 1970; TOMIYASU & ZENITANI, 1957).

#### B. BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS (BNV)

Os compostos nitrogenados não protéicos (NNP), nos músculos de pescado, estão dissolvidos nas células do plasma e no fluido intercelular. Eles são prontamente extratáveis se os músculos são tratados com água. Na maioria dos peixes, eles constituem uma pequena fração do material nitrogenado do músculo. Neste grupo de substâncias estão incluídos: bases nitrogenadas, aminoácidos, amidas e derivados guanidínicos, imidazólicos e purínicos (ZAITSEV *et alii*, 1969).

No grupo das bases nitrogenadas estão os compostos voláteis que podem caracterizar mudanças químicas que ocorrem em músculo de pescado durante a deterioração. Ao longo da estocagem em gelo, o conteúdo das bases nitrogenadas voláteis aumenta progressivamente em função dos processos enzimáticos e microbianos sendo, assim, útil na avaliação do frescor do pescado (SHEWAN *et alii*, 1971).

Dentro da denominação genérica de bases nitrogenadas voláteis, encontram-se diferentes substâncias, principalmente em ordem de importância : amônia, trimetilamina, dimetilamina, etilamina e monometilamina (REPOSI, 1968).

A quantidade de bases nitrogenadas voláteis em músculo de pescado muito fresco, logo após a captura, costumadamente não excede o valor de 15 a 20 mg de nitrogênio por 100 g de músculo. A principal substância presente é a amônia (3 a 20 mg); há também uma pequena quantidade de trimetilamina (2 a 2,5 mg em peixe marinho e 0,5 mg em peixe de água doce) , enquanto que a monometilamina e dimetilamina apenas ocorrem em traços (menos que 0,1 mg) (ZAITSEV *et alii*, 1969).

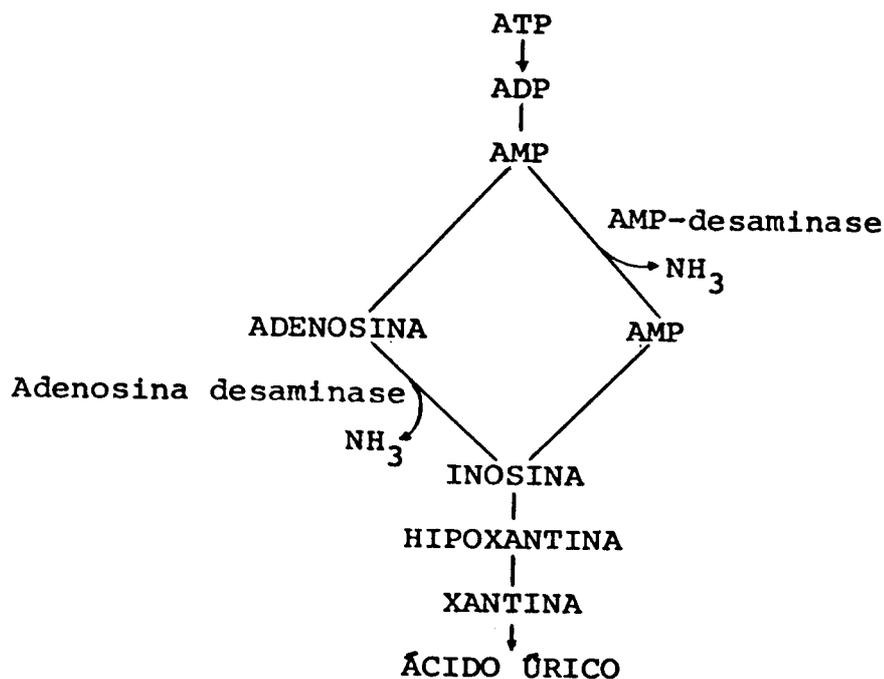
### 1. Amônia

A formação de amônia geralmente esta correlacionada com a degradação do ATP, degradação de aminoácidos e hidrólise da uréia.

### a. Degradação do ATP

A exata concentração de amônia em músculo de peixe fresco depende da extensão com que a adenosina 5'-trifosfato tenha sido desaminada antes da morte. Tal desaminação, se não ocorreu *in vivo*, toma lugar rapidamente após a morte (JONES, 1961). O ATP é normalmente degradado dentro de 1 a 2 dias, em peixes estocados a 0°C (STONE, 1971).

A degradação do ATP em músculo de peixe é representada, de maneira simplificada, a seguir (CATTANEO *et alii*, 1979; CHEUK *et alii*, 1979; KASSERSARN *et alii*, 1965) :



O caminho principal de formação de amônia varia de acordo com a espécie de peixe (STONE, 1971; STONE, 1970 ; FLICK & LOVELL, 1972) .

## b. Hidrólise da uréia

A ocorrência de um alto nível de uréia no músculo, sangue e órgãos é uma característica dos peixes elasmobrânqueos, onde espécies marinhas (tubarão, raia) apresentam de 1 a 2,5% e espécies de água doce ao redor de 1% (BALDWIN, 1967). Em outras espécies comerciais, o nível de uréia geralmente é desprezível (bacalhau 1,9 mg%, arenque 4,0 mg% e eglefin 14,5 mg%) (SIMIDU, 1961).

A síntese de uréia pela ação da arginase sobre a arginina, em elasmobrânqueos, não se restringe somente ao fígado, como ocorre em animais terrestres mas também atinge todo o corpo, onde é encontrada arginase em quantidades elevadas. A grande quantidade de uréia presente nestas espécies sugere que esta substância pode ter um papel importante no metabolismo. Geralmente, tem sido aceito que a uréia é responsável pela regulação osmótica dos fluidos do corpo e também como um produto da detoxificação da amônia (BALDWIN, 1967; SIMIDU, 1961).

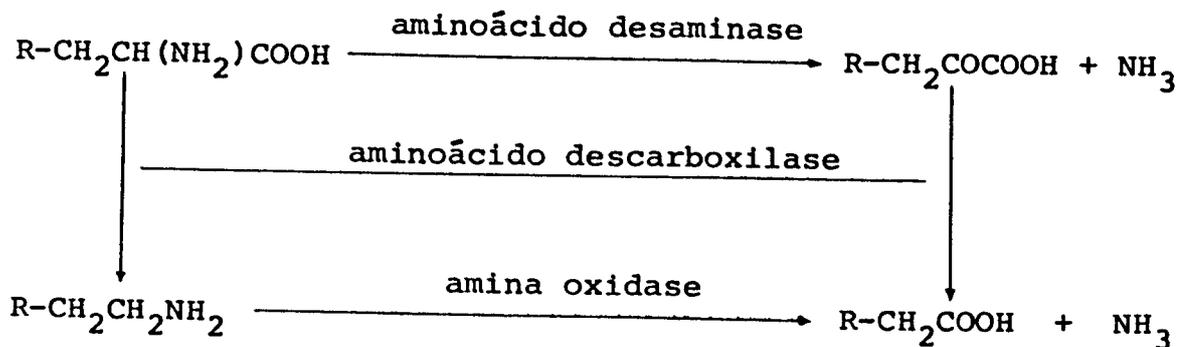
Durante algum tempo pensou-se que a urease do próprio músculo fosse responsável, por si só, pela formação de amônia em elasmobrânqueos, mas a sua pequena quantidade no músculo e testes com antissépticos revelaram que a decomposição da uréia era causada principalmente pela urease de origem bacteriana (TOMIYASU & ZENITANI, 1957).

A presença de arginase em cauda de camarão tem sido detectada, de modo que a formação de amônia via arginina

pode potencialmente acontecer através da uréia e urease bacteriana (YEH *et alii*, 1978).

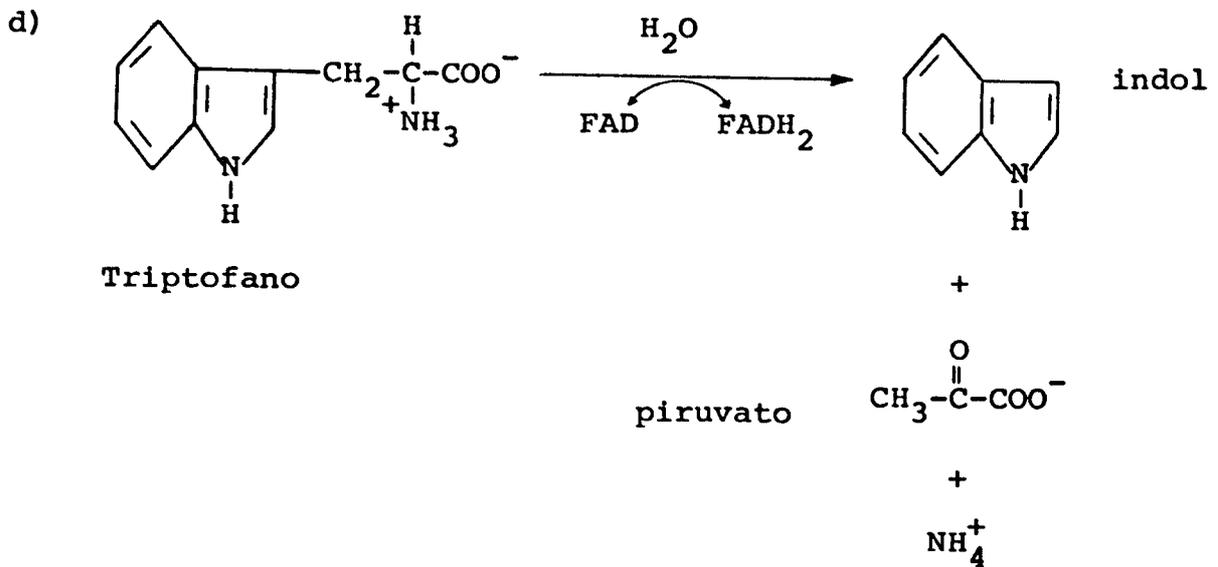
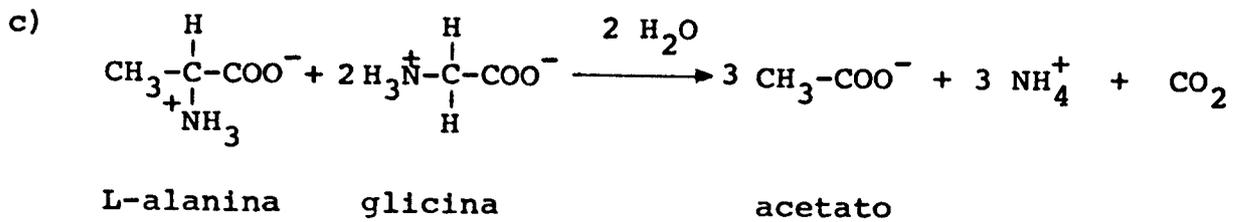
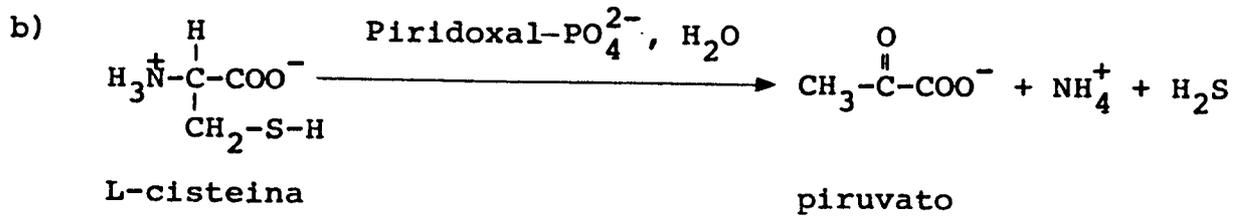
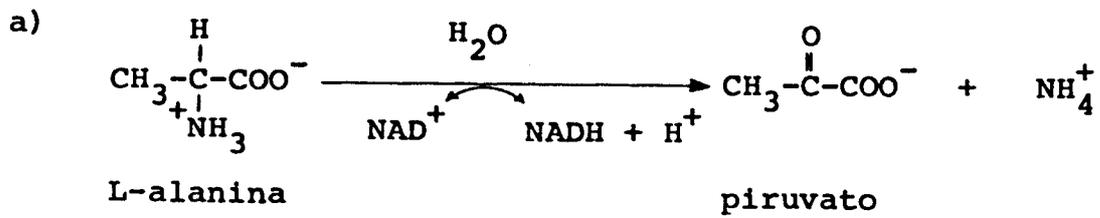
### c. Degradação de aminoácidos

O principal caminho de liberação de amônia a partir de aminoácidos pode ser representado como segue, embora o processo de desaminação possa variar em função da diferenciação bacteriana (TOMIYASU & ZENITANI, 1957):



No começo do estágio de deterioração, os aminoácidos são convertidos às correspondentes aminas pelas descarboxilases bacterianas, pelo menos em condições ácidas, e então a amônia é liberada da amina, principalmente por uma amina oxidase. Esta última enzima está apta para agir sob larga variação de pH, desde levemente ácido a básico.

Algumas reações de aminoácidos com a formação de amônia são mostradas a seguir (LASZLO, 1975) :



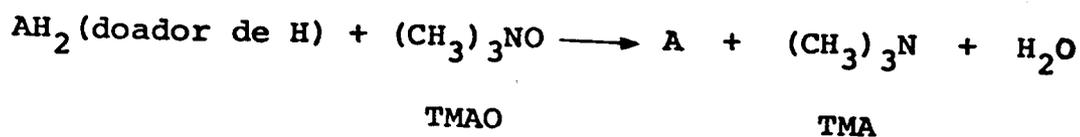
## 2. Trimetilamina

A mais conhecida das aminas voláteis é a trimetilamina que é derivada possivelmente, em parte, por enzimas autolíticas mas, certamente, pela ação bacteriana sobre o óxido de trimetilamina, um composto que está presente nos músculos de pescados marinhos (SIMIDU, 1961). Os peixes de água doce geralmente contêm baixo teor de óxido de trimetilamina tornando, portanto, a quantificação de trimetilamina inviável como parâmetro de avaliação de frescor nessas espécies (CONNEL, 1975).

O óxido de trimetilamina é encontrado no músculo de diferentes espécies de teleósteos em quantidades de 100 a 1.080 mg%, em cartilagosos, de 250 a 1.430 mg% e em peixes de água doce e migratórios (salmão), em quantidades de até 185 mg%. O conteúdo de óxido de trimetilamina varia de acordo com a idade do peixe e estação do ano. O músculo lateral escuro do peixe, geralmente contém mais óxido de trimetilamina do que a carne branca (ZAITSEV *et alii*, 1969).

Alguns experimentos sugerem que o óxido de trimetilamina é exclusivamente de origem exógena e, em tal caso, parece originar-se do zooplâncton. Este composto, fisiologicamente, funcionaria como regulador da pressão osmótica do músculo (SIMIDU, 1961) e forma de detoxificação da amônia (BALDWIN, 1967).

Em 1939, D.W. Watson, segundo TOMIYASU & ZENITANI (1957), propôs a seguinte sequência, para a transformação de óxido de trimetilamina (TMAO) para trimetilamina (TMA) :



estabelecendo que glicose, glicogênio, lactato e piruvato poderiam ser doadores.

COBB *et alii* (1973) e CASTRO (1975) verificaram a inviabilidade do uso do teste de determinação de TMA como índice de qualidade para camarão conservado em gelo, pois constataram que a água de degelo arrastava grande parte da trimetilamina do músculo. No trabalho de CASTRO (1975), com camarão sete barbas (*Xiphopeneus kroyeri*) em gelo, observou-se lavagem de até 97% da TMA total produzida.

### 3. Dimetilamina

A dimetilamina encontra-se em quantidades inferiores a 0,1 mg% em espécies marinhas e de água doce (ZAITSEV *et alii*, 1969), sendo mais frequente em gadídeos (RITSKES, 1975).

O precursor da dimetilamina ainda não é bem conhecido, mas segundo LASZLO (1975), pode ser o óxido de trimetilamina.

O aumento do conteúdo de dimetilamina se dá logo no início da deterioração, anterior ao acrêscimo de trimetilamina (JONES, 1967) .

### C. DETERMINAÇÃO DE BNV COMO TESTE DE FRESCOR

As pesquisas envolvendo a determinação de amônia e de bases nitrogenadas voláteis (BNV) como parâmetros de avaliação do grau de deterioração em pescado, segundo FARBER(1965) vêm, desde o século passado, constituindo-se num dos primeiros métodos químicos a serem empregados.

Existe muita controvérsia entre os pesquisadores no sentido de se estabelecer limites superiores de BNV para avaliar o grau de frescor de pescado. As sugestões para tal índice variam de 20 a 60 mg de nitrogênio volátil por 100 g de músculo de pescado, dependendo da espécie em estudo (FARBER, 1965; ANTONACOPOULOS, 1973).

No Japão, a determinação de BNV é utilizada quase que exclusivamente como índice químico para estimar o grau de frescor de pescado de todas as espécies (exceto tubarão) e é empregado um método oficial que limita a condição de aceitabilidade até 30 mg (COBB & VANDERZANT, 1975; TOMIYAMA *et alii*, 1956). Este limite também é utilizado por órgãos oficiais na Alemanha (ANTONACOPOULOS, 1973), Argentina (LUPIN & TRUCCO, 1978) e Austrália (COBB & VANDERZANT, 1975).

No Brasil, o teor de BNV em pescado deve ser inferior a 30 mg N/100 g de músculo, para a caracterização do pescado fresco (BRASIL, 1974), sendo sugerido o método de microdifusão, muito embora o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976) utilize o método de Lucke & Geidel, modificado.

A determinação de compostos nitrogenados básicos voláteis, embora seja largamente utilizada na estimativa da qualidade do pescado fresco, não é muito recomendável para a detecção de material decomposto em produtos como: enlatados, salgados e salgados dessecados, porque alguns desses compostos são formados durante o processamento (HILLIG *et alii*, 1958; FARBER & FERRO, 1956; LUPIN & TRUCCO, 1978).

### 1. Métodos para determinação de BNV

Os métodos analíticos para a quantificação de BNV em pescado sofreram, ao longo do tempo, uma série de modificações que visavam, além de uma análise mais acurada dos compostos nitrogenados voláteis, uma diminuição do tempo de análise e de sua aplicação eficiente em plantas industriais e órgãos oficiais de inspeção.

Um dos métodos mais utilizados é aquele que foi proposto por Lucke & Geidel, 1935, e que é descrito por PEARSON (1976). Consiste basicamente na utilização de um aparelho de destilação macro-Kjeldahl, sendo que o músculo triturado é destilado diretamente com óxido de magnésio como agente alcalino.

O método de microdifusão, segundo STANSBY *et al.* (1944), vem da modificação feita por Beatty & Gibbons em 1936, para utilização em pescado, a partir da técnica de microdifusão desenvolvida por CONWAY & BYRNE (1933). Utiliza-se um ex

trato tricloroacético do músculo e carbonato de potássio como agente alcalino.

STANSBY *et alii* (1944) propuseram a extração preliminar das bases nitrogenadas, do músculo, com uma solução de álcool etílico. A determinação era realizada em um aparelho de destilação macro-Kjeldahl.

TOMIYAMA *et alii* (1956) sugeriram a utilização de um aparelho de destilação a vácuo, diminuindo o tempo de destilação para 5 minutos. A precipitação preliminar das proteínas foi realizada com sulfato de magnésio em meio ácido a pH 2 e na destilação utilizou-se hidróxido de sódio.

GAGNON & FELLERS (1958) utilizaram também a destilação direta do músculo e hidróxido de sódio.

ANTONACOPOULOS (1973,p.256) alterou o método de Lucke & Geidel diminuindo o tempo de destilação para 10 minutos.

No método proposto pelo Instituto de Fomento Pesqueiro do Chile (IFOP), em 1971, descrito por MORGA(1975), utilizou-se a precipitação preliminar das proteínas com ácido tricloroacético e destilação de uma aliquota com óxido de magnésio, recolhendo-se aproximadamente 150 mL de destilado.

BILLON *et alii* (1979) sugeriram um método no qual a destilação é feita com injeção direta de vapor e um extrato tricloroacético do músculo de pescado. O agente alcalinizante é o hidróxido de sódio e o tempo de destilação foi substituído por uma quantidade de 40 mL de destilado recolhido.

GIANNINI *et alii* (1979) sugeriram o recolhimento de uma quantidade fixa de destilado. Para o método de Lucke & Geidel foi proposta uma quantidade de 180 mL e para o de Antonacopoulos, 250 mL. Com esses cuidados verificou-se , entre o métodos, uma dispersão inferior a 3% .

## 2. Variações dos métodos analíticos

As diferenças entre os métodos analíticos ba seiam-se fundamentalmente em três aspectos: a) preparo da amostra, b) agente alcalinizante para liberar as bases voláteis e, procedimento para deslocar a fração volátil.

A análise pode ser realizada utilizando-se o músculo triturado diretamente ou um extrato desproteínizado . A hidrólise de proteínas e de outros compostos nitrogenados pode contribuir com um acréscimo de compostos nitrogenados voláteis por efeito dos agentes alcalinos empregados, portanto, essa interferência deve ser minimizada. Dentre os agentes químicos utilizados na precipitação preliminar das proteínas, empregados na determinação de BNV, citam-se: ácido tricloroacético, ácido fosfotungstico e álcool etílico (STANSBY *et alii*, 1944).

O agente alcalino empregado para liberar as bases voláteis pode interferir na determinação do teor de BNV em função do pH ou de sua força como base. Compostos como o

Óxido de magnésio (PEARSON, 1976), hidróxido de sódio (BILLON *et alii*, 1979) e carbonato de potássio (CONWAY & BYRNE, 1933) são exemplos já utilizados em diversos métodos.

O procedimento analítico para deslocar as bases voláteis para o meio receptor pode interferir no tempo de análise e, basicamente, pode ser realizado por: a) aeração , b) difusão e c) destilação simples, a vapor e a vácuo.

STANSBY *et alii* (1944) descrevem vantagens e desvantagens de alguns métodos de determinação de BNV:

a) Microdifusão

vantagens: economia de tempo com a possibilidade de realizar testes múltiplos, baixa temperatura assegurando decomposição mínima de compostos nitrogenados .

desvantagens: carência de alta precisão, equipamento especial, grande cuidado na limpeza de materiais e na titulação (microbureta).

b) Aeração

vantagens: baixa temperatura, fácil preparo da amostra

desvantagens: equipamento especial, longo tempo de aeração.

c) Destilação direta do músculo

vantagens: tempo curto de análise

desvantagens: excessiva formação de espuma, dificuldade para a limpeza rápida do aparelho, alta temperatura com a possibilidade de degradação de compostos nitrogenados.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### A. MATERIAIS

##### 1. Matéria-prima

Neste trabalho foram utilizados peixes de origem marinha, sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e cação (família Squalidae) (NELSON, 1973) e de água doce, tilápia (*Tilapia* sp.) e curimatã (*Prochilodus* sp.).

Com excessão da tilápia, os demais peixes foram adquiridos junto a estabelecimentos comerciais, na cidade de Campinas-SP, em condições normais de comercialização em diversas épocas do ano. O cação foi adquirido já cortado em postas e o curimatã, eviscerado. O material foi conduzido para o laboratório e estocado em caixa isotérmica com gelo picado ou em refrigerador.

As tilápias foram obtidas em Maio-1981, de uma lagoa pertencente à Fazenda Santana, localizada em Valinhos-SP. Foram capturadas por meio de redes e transportadas imediatamente para o laboratório. Os peixes foram separados em dois grupos. O primeiro, com cerca de 100 exemplares, foi estocado em gelo e acompanhou-se a evolução de BNV em função do tempo de estocagem. O segundo grupo, cerca de 20 exemplares, foi analisado imediatamente para se saber o teor de BNV logo após a morte do pescado a um tempo zero de estocagem.

## 2. Reagentes

Óxido de magnésio, PA  
Ácido bórico, PA  
Vermelho de metila, PA  
Verde de bromocresol, PA  
Alcool etílico absoluto  
Ácido clorídrico, PA  
Hidróxido de sódio, solução padrão 0,1N (MERCK)  
Ácido tricloroacético, PA  
Ácido sulfúrico, PA  
Sulfato de sódio anidro, PA  
Tetraborato de sódio decaidratado (Borax), PA  
Carbonato de sódio, PA  
Hidróxido de sódio, PA  
Cloreto de amônio, PA  
Hidrocloreto de trimetilamina, PA  
Uréia, PA  
Parafina em bloco

## 3. Equipamentos

Moedor de carne FILIZOLA  
Liquidificador SUNBEAN, IMPERIAL VIII  
Refrigerador Gelomatic-Freezer 360  
Balança analítica AINSWORTH  
Balança semi-analítica SAUTER  
pH-metro B-221 Micronal  
Destilador (vide Figura 1)

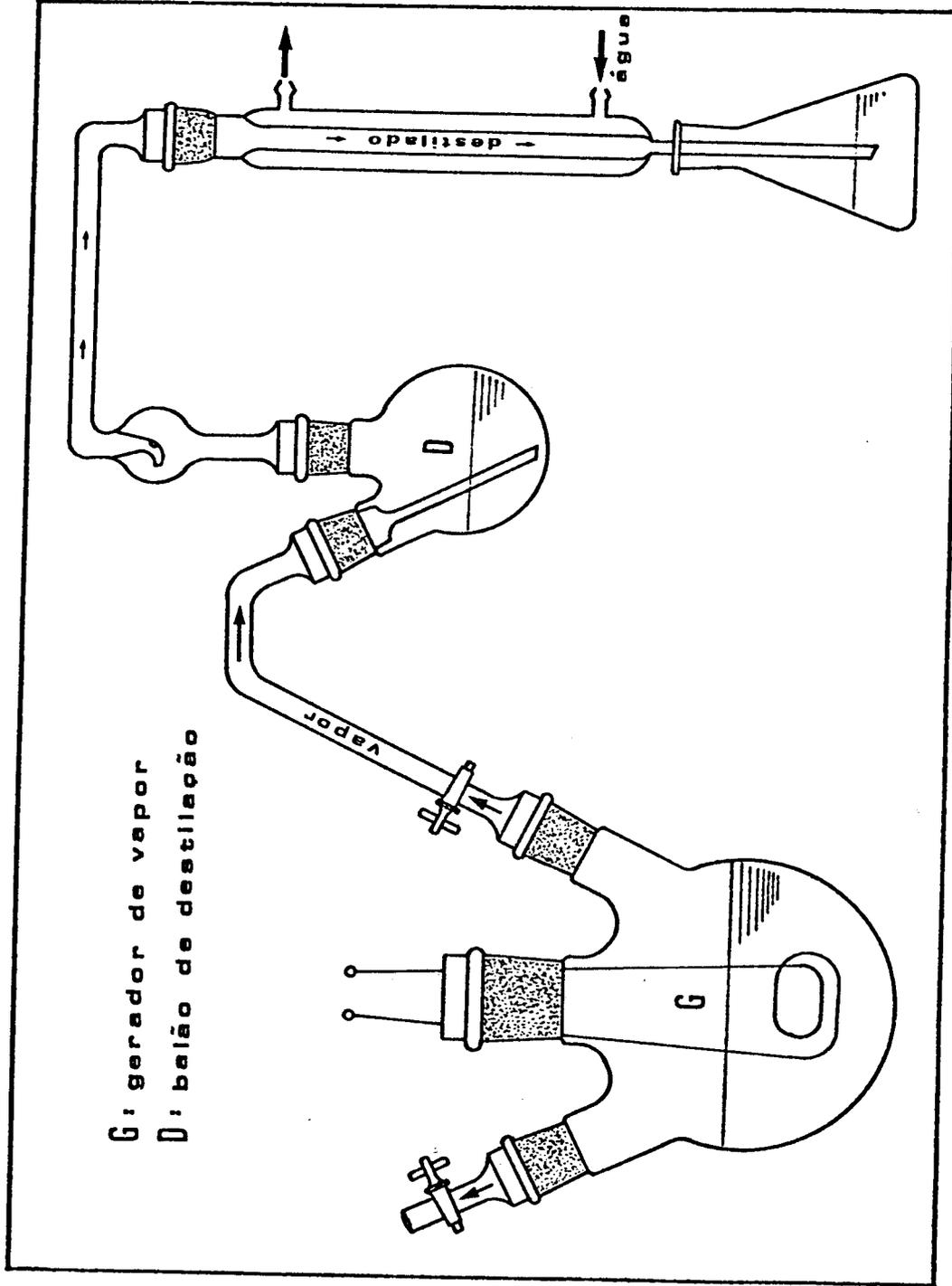


FIGURA 1. Esquema do aparelho de destilação para determinação de BNV.

## B. MÉTODOS

### 1. Preparo dos reagentes

#### a. Solução de ácido tricloroacético 5%

Foram pesados 50 g de ácido tricloroacético e o volume completado para 1000 mL com água destilada.

#### b. Soluções de ácido sulfúrico-sulfato de sódio anidro

As soluções foram preparadas com ácido sulfúrico concentrado e sulfato de sódio anidro e o volume completado para 1000 mL com água destilada, conforme o Quadro 1.

#### c. Solução de ácido bórico com indicador misto

Foram pesados 150 mg de verde de bromocresol e 300 mg de vermelho de metila e dissolveu-se cada indicador em 100 mL de álcool etílico absoluto.

Foram pesados 200 g de ácido bórico e o volume completado para 1000 mL de solução. A esta solução foram adicionados 15 mL da solução de verde de bromocresol 0,15% e 5 mL de solução de vermelho de metila 0,30%.

#### d. Solução saturada de tetraborato de sódio (Borax)

Foram pesados 50 g de Borax e o volume completado para 1000 mL com água destilada.

QUADRO 1. Quantidade de  $H_2SO_4$  concentrado e  $Na_2SO_4$  anidro, necessária para preparação de 1.000 mL de solução

Solução	$H_2SO_4$ (g)	$Na_2SO_4$ (g)
$H_2SO_4$ 5%- $Na_2SO_4$ 10%	50	100
$H_2SO_4$ 5%- $Na_2SO_4$ 7,5	50	75
$H_2SO_4$ 5%- $Na_2SO_4$ 5%	50	50
$H_2SO_4$ 5%- $Na_2SO_4$ 2,5%	50	25
$H_2SO_4$ 2,5%- $Na_2SO_4$ 10%	25	100
$H_2SO_4$ 2,5%- $Na_2SO_4$ 7,5%	25	75
$H_2SO_4$ 2,5%- $Na_2SO_4$ 5,0%	25	50
$H_2SO_4$ 2,5%- $Na_2SO_4$ 2,5%	25	25
$H_2SO_4$ 1,25%- $Na_2SO_4$ 10%	12,5	100
$H_2SO_4$ 1,25%- $Na_2SO_4$ 7,5%	12,5	75
$H_2SO_4$ 1,25%- $Na_2SO_4$ 5%	12,5	50
$H_2SO_4$ 1,25%- $Na_2SO_4$ 2,5%	12,5	25
$H_2SO_4$ 2,5%	25	-
$H_2SO_4$ 1,25%	12,5	-
$Na_2SO_4$ 10%	-	100
$Na_2SO_4$ 20%	-	200

e. Solução de hidróxido de sódio 10%

Foram pesados 100 g de NaOH e o volume completado para 1000 mL com água destilada.

f. Solução de carbonato de sódio 10%

Foram pesados 100 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e o volume completado para 1000 mL com água destilada.

g. Solução de cloreto de amônio 0,1%

Foram pesados  $100 \pm 1$ mg de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e o volume ajustado para 100 mL com água destilada.

h. Solução de hidrocloreto de trimetilamina 0,1%

Foram pesados  $100 \pm 1$  mg de  $(\text{CH}_3)_3\text{N.HCl}$  e o volume ajustado para 100 mL com água destilada.

i. Solução de uréia 0,8%

Foram pesados  $400 \pm 1$  mg de  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  e o volume ajustado para 500 mL com água destilada.

j. Ácido clorídrico 0,02 N

Foram diluídos 6,5 mL de HCl concentrado (36,5 - 37%) em 2000 mL de água destilada e padronizou-se com solução de NaOH 0,02 N , preparada por diluição de uma solução padrão 0,1 N (MERCK).

## 2. Preparo das amostras para determinação de BNV.

### a. Homogeneização da amostra

O pescado inteiro foi lavado, descamado, eviscerado e filetado. Os filés foram moídos num moedor de carne empregando um disco com furos de 3 mm e uma alíquota da massa triturada foi submetida imediatamente à destilação direta do músculo ou preparada na forma de extrato, segundo o método a ser testado.

### b. Preparo dos extratos

Foram pesados 50 g da massa triturada e adicionou-se 150 mL de solução extrativa.

A mistura de amostra e solução extrativa foi homogeneizada em liquidificador por 1 minuto e filtrada com papel filtro qualitativo em um sistema a vácuo. O resíduo foi reextraído, por 30 segundos no mesmo copo, com 50 mL de solução extrativa e filtrado no mesmo sistema filtrante. O volume total filtrado foi ajustado a 250 mL por lavagem do resíduo final com a solução extrativa. Os extratos foram conservados em refrigerador até o momento das análises.

### 3. Determinação de bases nitrogenadas voláteis (BNV)

Para a determinação de BNV, foi utilizado o método de Lucke & Geidel, descrito por PEARSON (1971), do Instituto de Fomento Pesqueiro do Chile (IFOP), descrito por MORGA (1975) e o método do IFOP modificado nesta pesquisa. Os dois primeiros métodos tiveram algumas modificações no que diz respeito à aparelhagem de vidro e reagentes químicos.

Foi empregado um aparelho de destilação, conforme o esquema mostrado na Figura 1, que constava de uma fonte de vapor com resistor elétrico, balão de destilação com trampa, condensador e juntas esmerilhadas. A fonte de vapor tinha duas saídas reguláveis que eram conectadas a dois aparelhos iguais, de modo que pudessem ser realizadas análises em duplicata, ao mesmo tempo.

O destilado era recolhido em ácido bórico 2% com indicador misto e titulado com ácido clorídrico 0,02 N.

a. Método de Lucke & Geidel, descrito por PEARSON(1976)

- Montar um aparelho de destilação macro-Kjeldahl.
- Macerar mecanicamente 10 g de peixe triturado com 100 mL de água. Transferir o conteúdo para o balão de destilação lavando com mais 200 mL de água.
- Adicionar 2 g de óxido de magnésio e um agente antiespumante (silicone ou álcool octílico).
- Receber o destilado em frasco contendo 25 mL de solução de ácido bórico 2% e algumas gotas de indicador (vermelho de metila), tal como o usado na determinação de proteínas.
- Aquecer o balão de destilação à ebulição e destilar por 25 minutos.
- Lavar o condensador com água destilada e titular o destilado com solução de ácido sulfúrico 0,05M(0,1N).
- Cálculo:

$$BVT = \frac{(A - B) \times N}{P} \times 100$$

(A - B) = gasto de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na titulação menos o branco

N = normalidade do ácido sulfúrico

P = peso de pescado na alíquota destilada (10g)

O resultado é expresso em mg N/100 g de pescado.

b. Método do Instituto de Fomento Pesqueiro do Chile (IFOP)  
descrito por MORGA (1975)

- 1) A 50 g do músculo homogeneizado adicionar 150 mL de ácido tricloroacético 5%. Homogeneizar por 1 minuto a 8.000 rpm. Deixar em repouso por 15 minutos.
- 2) Filtrar em papel de filtro. Ajustar a 250 mL num balão volumétrico lavando o filtro.
- 3) Em um balão de destilação adicionar 20 mL do filtrado, 150 mL de água destilada e 2 g de MgO. Fechar o balão e aquecer .
- 4) Receber o destilado em erlenmeyer contendo 20 mL de ácido bórico a 1% com indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol).
- 5) Destilar aproximadamente 150 mL.
- 6) Titular com HCl 0,02N até que se verifique a viragem da cor azul para rosa.
- 7) Fórmula para cálculo:

$$\text{mg de N volátil/100 g de pescado} = \frac{G \times N \times 14}{P} \times 100$$

G = volume de HCl 0,02 N gasto

N = normalidade do HCl

P = peso de pescado na alíquota destilada.

c. Método do IFOP modificado nesta pesquisa

- 1) Montar um aparelho de destilação conforme o esquema mostrado na Figura 1 .
- 2) Pesar 50 g de músculo de pescado triturado e adicionar 150 mL de solução de ácido sulfúrico 2,5%-sulfato de sódio 7,5% .
- 3) Macerar a mistura em um homogeneizador por 1 minuto e filtrar em um sistema a vácuo.
- 4) Retirar o resíduo e macerar com 50 mL de solução extrativa por 30 segundos. Passar a mistura pelo mesmo sistema filtrante anterior. Ajustar o volume total filtrado para 250 mL por lavagem do resíduo final com a solução extrativa.
- 5) Transferir 25 mL do filtrado para o balão de destilação e adicionar 25 mL de solução saturada de Borax.
- 6) Ligar o gerador de vapor e receber 50 mL de destilado em um frasco contendo 25 mL de solução de ácido bórico 2% com indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol)
- 7) Titular o destilado com ácido clorídrico 0,02 N .
- 8) Cálculo:

$$\text{BNV (mg N/100 g de pescado)} = \frac{\text{G} \times \text{N} \times 14}{\text{P}} \times 100$$

N = normalidade do HCl

P

G = volume de HCl gasto na titulação

P = peso de pescado na alíquota (5 g)

4. Ensaio comparativo entre o método de Lucke & Geidel e do IFOP .

a. Influência do tempo de destilação e do volume de destilado

Para verificar a influência do tempo de destilação e do volume destilado, as bases nitrogenadas voláteis foram quantificadas recolhendo-se alíquotas de destilado a intervalos de tempo pré-fixados. Os líquidos coletados foram quantificados quanto ao volume e ao gasto de ácido clorídrico na titulação de BNV.

b. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica

Para o método com destilação direta do músculo de sardinha foram utilizadas 10 alíquotas de amostras trituradas e as análises foram realizadas aos pares. As amostras que não estavam sendo utilizadas naquele momento foram colocadas, já pesadas, no refrigerador para evitar-se o acréscimo de BNV devido à temperatura ambiente.

Foram preparados 10 extratos de sardinha com ácido tricloroacético 5%. Os extratos também foram mantidos sob refrigeração até o momento das análises.

A análise estatística foi realizada segundo OSTLE (1963).

5. Estudos para modificação do método do IFOP.

a. Substituição de ácido tricloroacético por ácido sulfúrico-sulfato de sódio

Os extratos contendo as bases nitrogenadas voláteis de músculo de sardinha foram preparados utilizando-se 50g de amostra triturada e 150 mL de soluções extrativas .

Para determinação de BNV, foram destiladas alíquotas de 20 mL de extrato, em duplicata.

b. Substituição de óxido de magnésio (MgO) por Borax

A viabilidade da substituição de MgO por Borax foi verificada através de ensaios de recuperação de nitrogênio volátil em soluções puras de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e hidrocloreto de trimetilamina (  $(\text{CH}_3)_3\text{N.HCl}$  ) , em extratos de sardinha e nas misturas das soluções puras com os extratos.

Foram destilados, individualmente, 10 mL de soluções puras contendo 10,0 mg de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e 10,0 mg de  $(\text{CH}_3)_3\text{NHCl}$ , 20 mL de extratos (equivalente a 4 g de pescado) e a mistura das três amostras com as mesmas proporções anteriores. Para o deslocamento do nitrogênio volátil (NV) foram usados MgO(2 g ) e solução de Borax saturada (25 mL) .

c. Substituição de óxido de magnésio por outros agentes alcalinizantes

Extratos de sardinha foram preparados com ácido tricloroacético 5% e com ácido sulfúrico 2,5%-sulfato de sódio 7,5%, conforme item 2.b., sendo os mesmos destilados em presença de solução saturada de Borax (25 mL), óxido de magnésio (2 g), carbonato de sódio 10% (25 mL) e hidróxido de sódio 10% (25 mL) separadamente. Mediu-se o pH em todas as soluções puras e na mistura com os extratos, após a destilação.

d. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica

Foram preparados 10 extratos com cada solução de ácido tricloroacético 5% e 10 com ácido sulfúrico 2,5%-sulfato de sódio 7,5%, conforme item 2.b., sendo que os extratos tricloroacéticos foram destilados com óxido de magésio e os extratos com ácido sulfúrico em presença de solução saturada de Borax .

A análise estatística foi realizada segundo OSTLE (1963) .

6. Avaliação da hidrólise da uréia e de sua contribuição no teor de BNV.

a. Hidrólise da uréia em soluções puras

Alíquotas da solução padrão de uréia contendo 40 e 80 mg de uréia (5 e 10 mL de solução padrão) foram submetidas à destilação com os mesmos agentes alcalinizantes utilizados no item 5.c. e mediu-se o pH de forma análoga.

b. Hidrólise da uréia na mistura de soluções padrões com extratos de músculo de cação

Os extratos de músculo de cação foram preparados conforme item 2.b., utilizando-se ácido tricloroacético 5% e ácido sulfúrico 2,5%-sulfato de sódio 7,5% .

Alíquotas de 40 e 80 mg de uréia foram adicionadas a 20 mL de extratos e destiladas em presença dos mesmos agentes alcalinizantes utilizados no item anterior. As quantidades de uréia adicionadas correspondiam a 1 e 2% do peso de pescado na alíquota destilada (4 g) .

## 7. Determinação de BNV em pescados estocados em gelo.

As determinações de BNV em pescados estocados em gelo foram realizadas utilizando-se os três métodos analíticos descritos no ítem 3 .

### a. Preparo do pescado para conservação em gelo

#### Sardinha em filês

Visto que a intenção deste ensaio foi estabelecer as diferenças entre os métodos para determinação de BNV, foi considerado mais conveniente evitar-se os erros de amostragem do que respeitar as condições reais de estocagem. Por isso, os peixes foram primeiramente filetados e divididos em lotes , contendo cada um 5 filês. Os filês foram colocados em sacos de polietileno semi abertos de modo a permitir o contato com o ar . Os sacos, por sua vez, foram acondicionados numa caixa isotérmica com gelo picado. A água de degelo era drenada por um orifício aberto no fundo da caixa e o gelo repostado periodicamente. As determinações químicas foram realizadas durante 30 dias .

#### Sardinha e Tilápia

O pescado inteiro foi estocado em caixa isotérmica com gelo picado na relação 1:4 (pescado:gelo). A

drenagem da água de degelo foi realizada através de um orifício no fundo da caixa e a reposição do gelo foi periódica .  
As determinações químicas foram realizadas durante 11 dias para a sardinha e 21 dias para a tilápia

#### Cação em postas

As postas de cação foram colocadas em sacos de polietileno e acondicionadas em caixa isotérmica com gelo picado. As determinações químicas foram realizadas durante 11 dias.

#### Curimatã eviscerado

Os peixes foram estocados conforme o ítem anterior e analisados durante 11 dias .

#### b. Retirada de amostras

Foram retiradas, para as análises rotineiras, as seguintes quantidades de peixes: a) filés de sardinha- 2 sacos contendo 5 filés cada, b) sardinha inteira- 7 a 8 exemplares, c) tilápia- 10 exemplares, d) curimatã - 2 exemplares e e) cação - 2 porções (~250g) .

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### A. ENSAIOS COMPARATIVOS ENTRE O MÉTODO DE LUCKE & GEIDEL E DO INSTITUTO DE FOMENTO PESQUEIRO DO CHILE (IFOP)

#### 1. Influência do tempo de destilação e volume de destilado

O estudo da influência do tempo de destilação na determinação de BNV em músculo de sardinha, tanto para o método convencional como para o método com precipitação preliminar das proteínas com ácido tricloroacético, é mostrado na Figura 2 e Quadro 2 .

A comparação das curvas de evolução de BNV revela que os dois métodos apresentam importantes diferenças, seja na velocidade de destilação ou na quantidade total de BNV destiladas .

O deslocamento das bases nitrogenadas do extrato desproteínizado, método do IFOP, ocorre rapidamente e o seu teor não se altera após 5 minutos de destilação. Isto implica que as bases nitrogenadas voláteis deslocam-se sem impedimento até sua exaustão . TOMIYAMA *et alii* (1956), utilizando um método com destilação a vácuo e extrato desproteínizado com sulfato de magnésio, constataram o mesmo fenômeno .

Com a utilização do método de Lucke & Geidel, com destilação direta do músculo, nota-se que a curva de evo

QUADRO 2. Evolução de BNV, em músculo de sardinha, em função do tempo de destilação e volume destilado

A) Método de Lucke & Geidel

Tempo (minutos)	Destilado (mL)	BNV (mg N/100 g)
1	9,8	5,43
2	17,0	7,94
5	37,0	11,56
10	73,0	14,48
15	107,0	16,57
20	137,0	18,38
25	167,0	19,91
30	195,0	21,03
35	227,0	22,42
50	367,0	25,48

B) Método do IFOP

Tempo (minutos)	Destilado (mL)	BNV (mg N/100 g)
1	10,0	9,87
2	18,9	12,97
3	26,5	14,38
4	33,0	14,95
5	39,6	15,23
6	49,0	15,23
15	105,0	15,23

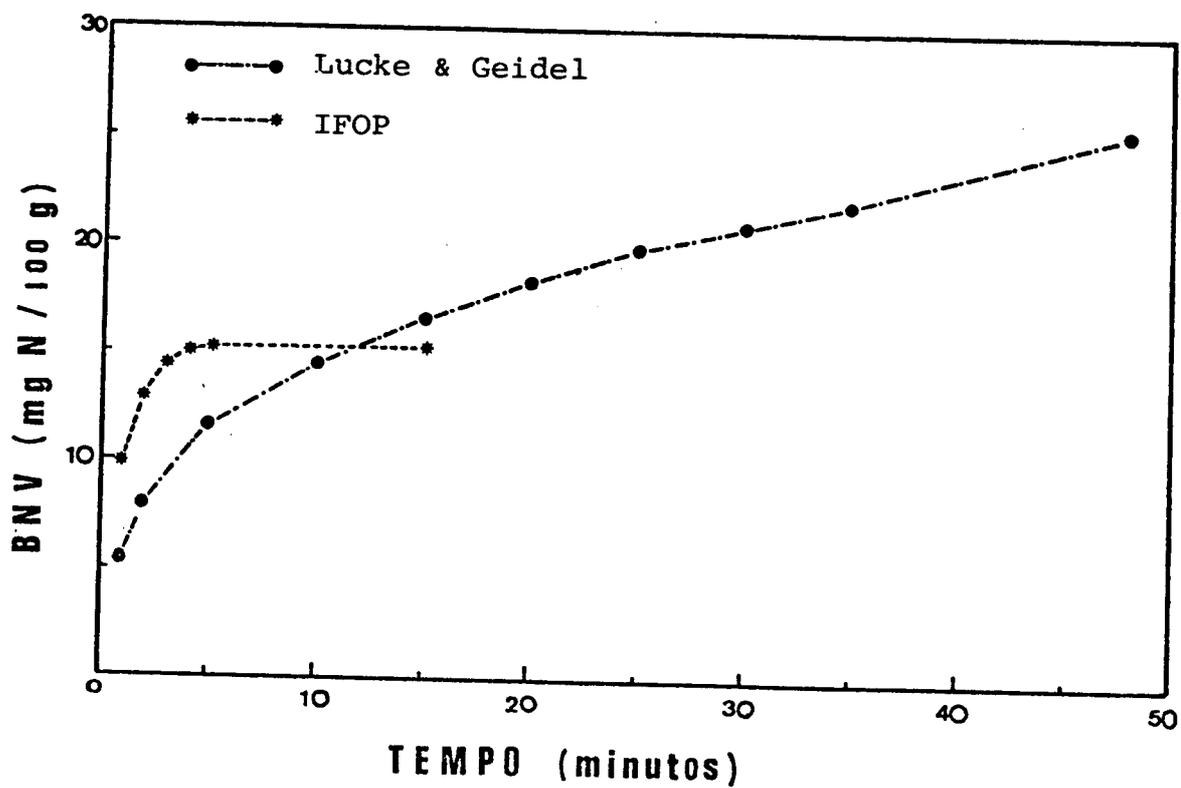


FIGURA 2. Evolução de BNV em músculo de sardinha em função do tempo de destilação.

lução das bases nitrogenadas voláteis, em função do tempo de destilação, apresenta um comportamento anormal que sugere a influência de vários fenômenos paralelos. A primeira parte da curva, até 10 minutos, deve corresponder às bases nitrogenadas voláteis existentes na forma livre, porém, já que elas ainda estão aprisionadas na estrutura do músculo, a velocidade de destilação é um pouco menor do que no extrato tricloroacético. Após 10 minutos, o teor de BNV não se estabiliza, ao contrário, aumenta continuamente, chegando a ser quase uma função linear do tempo de destilação. Acreditamos que este acréscimo é causado pelas condições analíticas, não representando necessariamente produtos metabólicos da deterioração dos tecidos musculares. As bases nitrogenadas voláteis adicionais poderiam gerar-se da hidrólise das amidas dos ácidos glutâmico e aspártico devido ao aquecimento das proteínas em meio alcalino (pH 9,0) .

Outra fonte de BNV pode ser a uréia, que é capaz de gerar amônia tanto pelo aquecimento em meio alcalino como pela ação da urease. O efeito da contribuição da hidrólise da uréia no teor de BNV será examinado em experimentos posteriores .

As curvas de evolução das bases nitrogenadas voláteis em função do volume de destilado aparece na Figura 3.

Visto que o volume de destilado é uma função do tempo de destilação e do fluxo de vapor, as duas figuras são semelhantes e confirmam a suposição de que a determinação

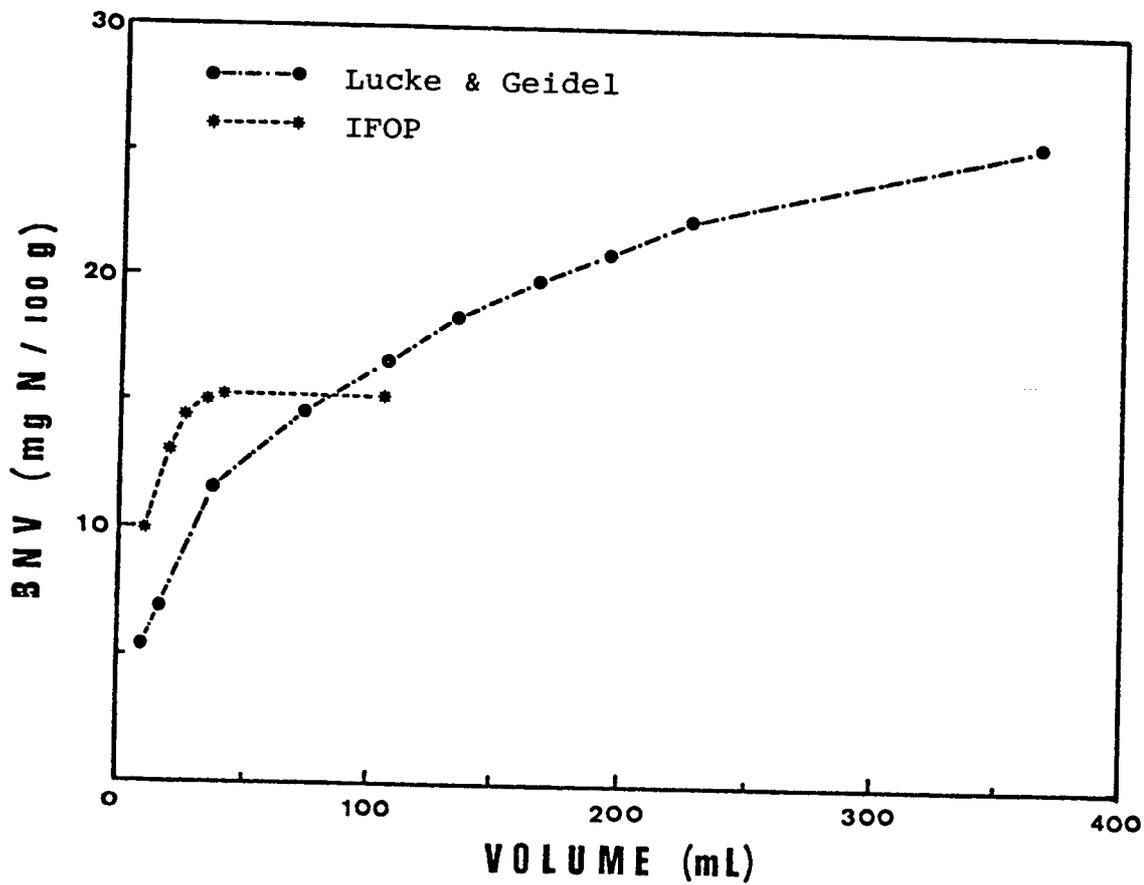


FIGURA 3. Evolução de BNV em músculo de sardinha em função do volume destilado.

de BNV pela destilação direta do músculo propicia artificialmente resultados elevados. O método convencional fixa um tempo de destilação de 25 minutos, porém, de acordo com as Figuras 2 e 3, não é possível deduzir após quantos minutos ou mL foram destiladas as bases nitrogenadas voláteis originais e em que ponto começou a influir o nitrogênio volátil gerado das proteínas. Uma modificação no método convencional foi proposta por GIANNINI *et alii* (1979), onde foi sugerida a substituição do tempo de destilação de 25 minutos pelo recolhimento de um volume de 180 mL de destilado e a justificativa era baseada no fato de que o processo de destilação dependeria da condição do equipamento empregado.

A eliminação das proteínas antes da destilação se apresenta como uma medida muito recomendável para a obtenção de valores de BNV que realmente representem o estado de deterioração do pescado.

## 2. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica

O Quadro 3 apresenta os valores de BNV obtidos em músculo de sardinha com a utilização dos dois métodos .

Com o método convencional, por destilação direta do músculo, foi obtido um valor médio de 19,00mg contra 15,54mg de nitrogênio por 100 gramas de músculo , do método com precipitação preliminar das proteínas com ácido tricloroacético, representando uma diferença de 22% . A avaliação

QUADRO 3. Avaliação da reprodutibilidade analítica do método de Lucke & Geidel e IFOP.

Determinação	BNV (mg N/100 g)	
	Lucke & Geidel	IFOP
1	17,31	15,57
2	21,10	15,28
3	18,39	15,71
4	16,77	15,85
5	19,20	15,52
6	19,47	15,52
7	20,02	15,75
8	21,15	15,21
9	17,04	15,38
10	19,58	15,61
$\bar{x}$	19,00	15,54
desvio padrão	1,51	0,19
coeficiente variação	7,95%	1,25%

estatística dos valores de BNV, obtidos com os dois métodos , revela que a reprodutibilidade analítica do método do IFOP , com desvio padrão de 0,19 e coeficiente de variação de 1,25%, é bem superior ao método de Lucke & Geidel, que apresentou um desvio padrão de 1,51 e coeficiente de variação de 7,95%.

A análise de variância dos dados do Quadro 3 é mostrada no Quadro 4. Podemos verificar que existe diferença significativa a nível de 1%, entre os métodos .

QUADRO 4. Análise de variância entre os métodos de Lucke & Geidel e do IFOP

	GL	SQ	QM	F	F <sub>tab.</sub>
Métodos	1	59,97	59,97	46,85	8,10 (1%)
Erro	18	23,09	1,28	-	-
Total	19	83,05	-	-	-

## B. ESTUDOS PARA MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DO IFOP

### 1. Substituição da solução de ácido tricloroacético pela solução de ácido sulfúrico-sulfato de sódio

As vantagens da precipitação preliminar das proteínas com ácido tricloroacético, na determinação de BNV, foram tão evidentes que despertaram interesse no sentido de se saber se a precipitação por outros agentes proporcionaria os mesmos efeitos benéficos. Em razão do custo, foi tentado o emprego de ácido sulfúrico em combinação com sulfato de sódio como agente precipitante.

O Quadro 5 mostra os resultados de BNV em extratos de músculo de sardinha desproteinizados com soluções de ácido sulfúrico-sulfato de sódio e solução de ácido tricloroacético.

Os valores de BNV encontrados nos extratos com ácido sulfúrico foram levemente superiores aos obtidos com ácido tricloroacético. Essa diferença, aparentemente, é devida a uma dissociação mais eficiente das bases nitrogenadas ligadas às estruturas celulares, por efeito dos íons  $\text{Na}^+$  durante a extração. A ocorrência de hidrólise das amidas pelo ácido sulfúrico pode ser descartada, já que o seu pH não difere de modo acentuado em relação ao pH obtido com a solução de ácido tricloroacético.

Embora os teores de BNV, obtidos em extratos com diferentes proporções de ácido sulfúrico e sulfato de sódio

QUADRO 5. Determinação de BNV em extratos de sardinha preparados com solução de ácido tricloroacético e de ácido sulfúrico-sulfato de sódio.

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	pH	BNV (mg N/100 g)
	10	1,00	11,11
	7,5	1,00	11,01
5	5	1,00	10,96
	2,5 <sup>a</sup>	1,00	11,01
	10	1,40	10,92
	7,5	1,30	11,21
2,5	5	1,20	11,21
	2,5 <sup>a</sup>	1,10	11,01
	10	1,75	10,92
	7,5	1,70	11,01
1,25	5	1,65	11,16
	2,5 <sup>a</sup>	1,60	10,92
ácido tricloroacético		1,30	9,66

a - Filtração difícil

dio, tenham sido mais ou menos semelhantes, as dificuldades para a filtração dos extratos foram maiores quando as concentrações de sulfato de sódio nas soluções eram inferiores a 5% . As concentrações de ácido sulfúrico, no entanto, não foram críticas, por isso foi escolhida uma solução de ácido sulfúrico a 2,5% com 7,5% de sulfato de sódio anidro. Com esta mistura, as proteínas ficam coaguladas de forma densa e em flocos grandes. O emprego de ácido sulfúrico sem a adição de sulfato de sódio acarretou em problemas na filtração e os extratos ficaram turvos.

## 2. Substituição de óxido de magnésio por tetraborato de sódio (Borax)

Na etapa de destilação do procedimento analítico para determinação de BNV, desde há muitos anos, tem sido usado óxido de magnésio (MgO) para o deslocamento das bases nitrogenadas voláteis. Este composto mantém um pH ao redor de 9,5 durante a destilação sendo, ainda, um reagente caro que é utilizado em grandes quantidades (1-2 g) em cada determinação. Na busca de outro agente alcalinizante mais barato, foi estudada a possibilidade de substituição do MgO por uma solução de tetraborato de sódio (Borax) .

Para verificar as diferenças nos valores de BNV obtidos com o emprego dos dois agentes alcalinizantes, foi realizado um teste com soluções contendo bases voláteis puras , amônia e trimetilamina e com extratos desproteinizados de

músculo de sardinha, com e sem adição de bases voláteis puras. Os resultados deste experimento são apresentados no Quadro 6.

Percebe-se que os teores de nitrogênio volátil recuperados na destilação com MgO ou Borax são praticamente idênticos, tanto para as soluções padrões como para os extratos de pescado. O Borax tem ainda a vantagem de poder ser usado como solução, o que simplificaria as determinações em série.

### 3. Substituição de óxido de magnésio por outros agentes alcalinizantes

O Quadro 7 e Figura 4 apresentam os resultados de BNV obtidos pela utilização de óxido de magnésio, tetraborato de sódio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio, para destilação de extratos de músculo de sardinha obtidos tanto por precipitação preliminar com solução de ácido tricloroacético 5% como pela solução de ácido sulfúrico 2,5%-sulfato de sódio 7,5%.

O exame dos dados do Quadro 7 confirma que o emprego de MgO e Borax na destilação proporciona a obtenção de resultados semelhantes. Verifica-se, também, que a desproteção com solução de ácido sulfúrico e sulfato de sódio permite uma extração mais exaustiva das bases nitrogenadas.

Pela Figura 4, podemos verificar que o emprego de soluções mais alcalinas propicia um aumento considerável nos valores de BNV; por exemplo, com hidróxido de sódio o teor

QUADRO 6. Recuperação de nitrogênio volátil (NV) proveniente da destilação de soluções puras de  $(\text{CH}_3)_3\text{N.HCl}$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e, de extratos de sardinha.

amostra	agentes alcalinizantes			
	MgO		Borax	
	NV (mg)	recuperação (%)	NV (mg)	recuperação (%)
solução (a)	1,45	98,0	1,44	97,3
solução (b)	2,64	99,9	2,62	99,2
(a) + (b)	4,10	99,5	4,09	99,3
extrato (c)	0,58	-	0,57	-
(a)+(b)+(c)	4,59	97,7	4,59	97,9
extrato (d)	0,48	-	0,48	-
(a)+(b)+(d)	4,46	97,0	4,45	96,7

(a) = 10 mg de  $(\text{CH}_3)_3\text{N.HCl}$  (equivalente a 1,48 mg de NV)

(b) = 10 mg de  $\text{NH}_4.\text{Cl}$  (eq. a 2,64 mg de NV)

(c) = 20 mL de extrato ATC 5% (eq. a 4 g de pescado)

(d) = 20 mL de extrato  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5%- $\text{Na}_2\text{SO}_4$  7,5% (4 g pescado)

$$\text{recuperação (\%)} = \frac{\text{nitrogênio destilado}}{\text{nitrogênio teórico}} \times 100$$

QUADRO 7. Influência do meio alcalino na destilação de BNV em extratos e músculo de sardinha.

agente alcalino	BNV (mg N/100 g)		
	ATC 5%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,5% - Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7,5%	método de Lucke & Geidel
Borax (pH 9,0) <sup>a</sup>	12,68 (pH 8,4) <sup>b</sup>	13,29 (pH 8,5) <sup>b</sup>	-
MgO (pH 10,1) <sup>a</sup>	12,31 (pH 9,6) <sup>b</sup>	13,85 (pH 9,8) <sup>b</sup>	18,31 (pH 10,0) <sup>c</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10% (pH 10,9) <sup>a</sup>	15,30 (pH 10,4) <sup>b</sup>	15,72 (pH 10,4) <sup>b</sup>	-
NaOH 10% (pH 12,8) <sup>a</sup>	32,27 (pH 12,6) <sup>b</sup>	35,18 (pH 12,7) <sup>b</sup>	-

a - pH inicial das soluções alcalinas puras

b - pH na mistura com extratos após a destilação

c - pH na mistura com músculo após a destilação

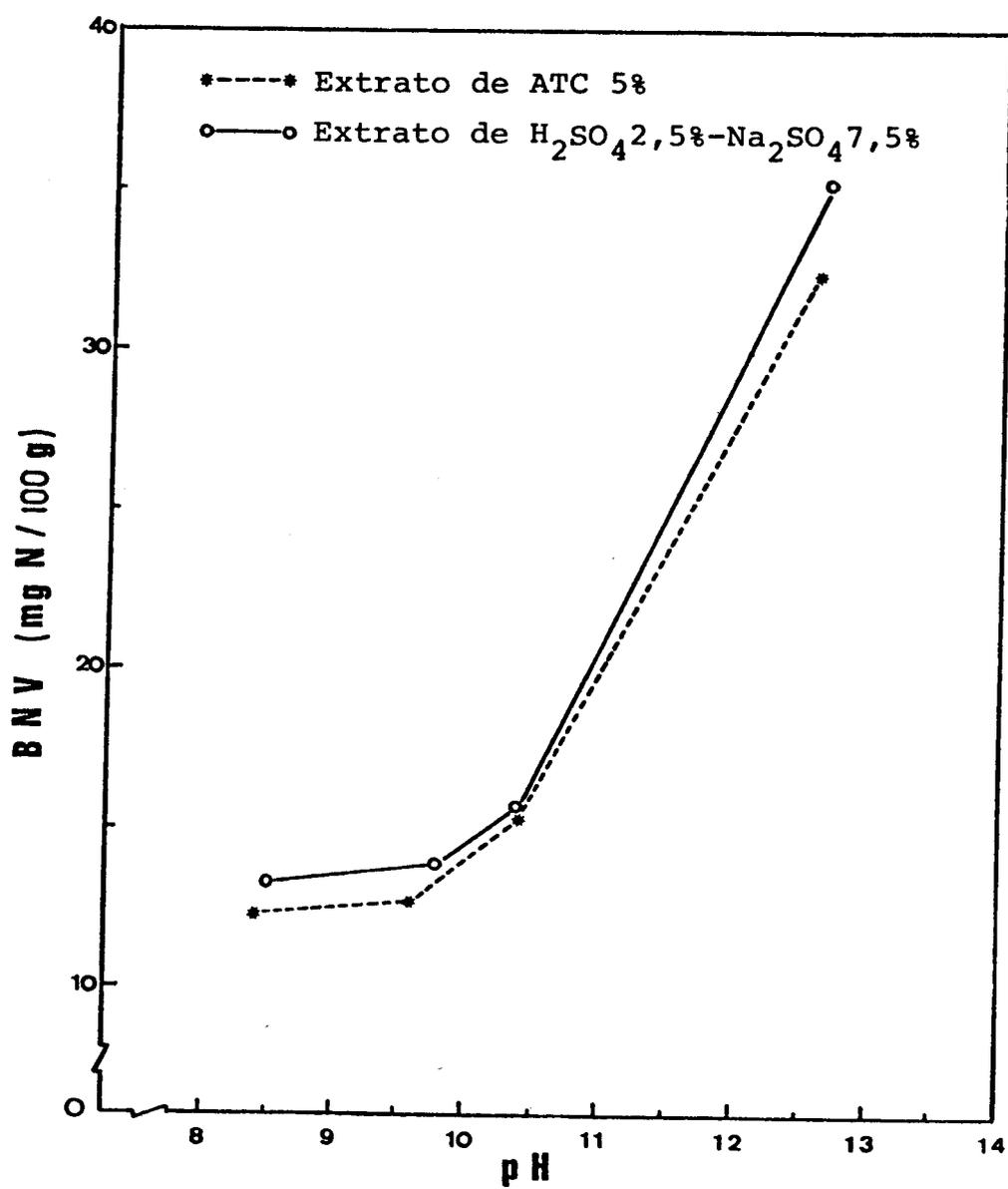


FIGURA 4. Relação de BNV e o pH empregado na destilação de extratos de sardinha.

de BNV gira em torno de 2,5 vezes o valor obtido com Borax . Por conseguinte, não se trata de um deslocamento mais eficiente das bases nitrogenadas voláteis senão de uma degradação alcalina do material nitrogenado, que se traduz pela liberação de amins voláteis e amônia.

Considerando que o material nitrogenado presente nos extratos ácidos não deveria conter proteínas, o aumento das bases nitrogenadas voláteis deve ocorrer à custa de peptídeos, nucleotídeos, uréia, aminoácidos e outros compostos de baixo peso molecular.

Aparentemente, o pH máximo que pode ser permitido está em torno de 10. A solução saturada de Borax, que após a mistura com o extrato desproteínizado resulta num pH entre 8,4 e 8,5 , oferece menores riscos de gerar substâncias interferentes. A utilização de solução de hidróxido de sódio 10% foi sugerida por BILLON *et alii* (1979), mas ficou aqui evidenciado que a sua utilização é uma prática desaconselhável.

#### 4. Avaliação estatística da reprodutibilidade analítica

O Quadro 8 apresenta os valores de BNV obtidos num mesmo estoque de sardinha , com os dois métodos que utilizam a precipitação preliminar das proteínas.

O valor médio de BNV obtido com o método modificado neste trabalho foi de 13,09 mg, sendo 10% superior àquele obtido com o método do IFOP, ou seja, 11,88 mg .

QUADRO 8. Avaliação da reprodutibilidade analítica do método do IFOP e IFOP modificado, empregados na determinação de BNV em músculo de sardinha.

Determinação	BNV (mg N/100 g)	
	IFOP	IFOP modificado
1	11,79	12,95
2	11,66	13,21
3	11,66	12,95
4	12,31	12,95
5	11,92	12,64
6	11,79	12,38
7	12,31	13,21
8	12,44	13,09
9	11,54	13,75
10	11,41	13,75
$\bar{x}$	11,88	13,09
desvio padrão	0,34	0,41
coeficiente variação	2,84%	3,13%

Os desvios padrões e os coeficientes de variação dos dados obtidos com os dois métodos são baixos e ficam muito próximos, indicando que ambos são confiáveis no tocante à reprodutibilidade analítica.

A análise de variância dos dados do Quadro 8 é mostrada no Quadro 9. Podemos verificar que existe diferença significativa, a nível de 1%, entre o método com precipitação tricloroacética e o método com precipitação sulfúrica.

QUADRO 9. Análise de variância entre o método do IFOP e IFOP modificado.

	GL	SQ	QM	F	F <sub>tab.</sub>
Métodos	1	7,26	7,26	45,38	8,10 (1%)
Erro	18	2,80	0,16	-	-
Total	19	10,06	-	-	-

### C. AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE DA URÉIA E DE SUA CONTRIBUIÇÃO NO TEOR DE BNV

De todos os compostos que potencialmente poderiam aumentar artificialmente o valor de BNV, a uréia é o mais provável, tanto pela sua ocorrência em teores relativamente elevados nos músculos de elasmobrânqueos (TOMIYASU & ZENITANI, 1957) como pela sua susceptibilidade para gerar amô

nia. A uréia não é removida na precipitação preliminar das proteínas, de modo que ela está presente em qualquer dos extratos de cação aqui examinados.

### 1. Hidrólise da uréia em soluções puras

O resultados apresentados nos Quadros 10 e 11 demonstram que a uréia, quando submetida à destilação em meio alcalino, é degradada em pequena quantidade por todos os agentes alcalinos desde pH 8,5 a 12,6. A degradação nos três primeiros meios (MgO, Borax e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ficou entre 0,96 e 1,07%, para uma adição de 40 mg de uréia e entre 0,96 e 1,20%, para adição de 80 mg de uréia. Quando foi utilizada a solução de NaOH 10% (pH 12,6) na destilação, a hidrólise da uréia foi notoriamente maior, atingindo 2,41% na amostra com 80 mg de uréia.

Mesmo que a porcentagem de uréia hidrolisada seja baixa, a quantidade de amônia proveniente da uréia deve influir de forma significativa na determinação de BNV em pescado, seja porque o teor de nitrogênio volátil é relativamente baixo nos peixes ou porque a amônia gerada da uréia é uma porcentagem do teor inicial e, conseqüentemente, nos peixes com teores elevados de uréia muscular, devem ocorrer erros maiores.

QUADRO 10. Determinação de nitrogênio amoniacal proveniente da hidrólise da uréia em soluções puras, pelo efeito da destilação em meios alcalinos.

Material destilado	mg de NA na aliquota destilada			
	Borax (pH 8,5)	MgO (pH 9,6)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 10,5)	NaOH (pH 12,6)
40 mg de uréia	0,20	0,18	0,21	0,44
80 mg de uréia	0,38	0,36	0,45	0,90

QUADRO 11. Porcentagem de uréia hidrolisada durante a destilação em meios alcalinos.

Material destilado	% hidrolisada (*)			
	Borax	MgO	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaOH
40 mg de uréia	1,07	0,96	1,12	2,35
80 mg de uréia	1,02	0,96	1,20	2,41

(\*)  $\% \text{ hidrolisada} = \frac{\text{mg de NA determinado}}{\text{mg de NA teórico}} \times 100$

NA teórico:

40 mg de uréia hidrolisada totalmente = 18,68 mg NA  
80 mg de uréia hidrolisada totalmente = 37,36 mg NA

## 2. Hidrólise da uréia na mistura de soluções padrões com os extratos de cação

Os resultados de BNV em extratos de cação são mostrados nos Quadros 12 e 13.

Em extratos de cação sem adição de uréia ( $C_1$  e  $C_2$ ), a influência do meio alcalino no teor de BNV destiladas é semelhante àquela encontrada anteriormente para sardinha, isto é, não houve grandes diferenças no teor de BNV para destilações em pH 8,5, 9,7 e 10,5, encontrando-se valores entre 29,98 e 35,82 mg de N/100 g de pescado. Todavia, a elevação do pH a 12,6 (NaOH) causou um aumento considerável, atingindo de 70,74 a 97,31 mg.

Pelos dados obtidos nos ensaios com adição de uréia, podemos observar que a hidrólise contribui significativamente na superestimação das bases nitrogenadas voláteis em músculo de cação. Verifica-se que, para adição de 40 mg de uréia, o menor índice de aumento foi de 13,46% na destilação com óxido de magnésio e o maior foi de 18,09, com hidróxido de sódio. A adição de 80 mg de uréia promoveu aumentos de 29,44 e 49,70% para os extratos destilados com MgO e Borax, respectivamente. Portanto, fica evidenciado que, mesmo a pH 8,5, a quantidade de nitrogênio amoniacal proveniente da hidrólise da uréia influi significativamente no teor de BNV.

Considerando-se que a alíquota de cação (4g) destilada deveria conter naturalmente entre 40 e 80 mg de

QUADRO 12. Influência da adição de uréia no valor de BNV em extratos de cação (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>) destilados com diversos alcalinizantes.

Material destilado	BNV (mg N/100 g)			
	Borax (pH 8,5)	MgO (pH 9,7)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 10,5)	NaOH (pH 12,6)
Extrato puro (C <sub>1</sub> )	29,98	30,57	31,77	70,74
C <sub>1</sub> + 40 mg uréia	37,58	34,97	42,67	83,54
C <sub>1</sub> + 80 mg uréia	44,88	39,57	46,87	101,44
Extrato puro (C <sub>2</sub> )	33,13	33,43	35,82	97,31
C <sub>2</sub> + 40 mg uréia	39,73	37,93	47,32	114,81
C <sub>2</sub> + 80 mg uréia	48,33	42,73	50,72	123,21

QUADRO 13. Porcentagem de aumento de BNV pela adição de uréia na alíquota de pescado destilado.

Material destilado	% de aumento			
	Borax	MgO	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NaOH
C <sub>1</sub> + 40 mg de uréia	25,35	14,39	34,31	18,09
C <sub>1</sub> + 80 mg de uréia	49,70	29,44	47,53	43,40
C <sub>2</sub> + 40 mg de uréia	19,92	13,46	32,10	17,98
C <sub>2</sub> + 80 mg de uréia	45,88	27,82	41,60	26,62

C<sub>1</sub> = alíquota do extrato de cação (4g) preparado com ATC 5%.

C<sub>2</sub> = alíquota do extrato de cação (4g) preparado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5% - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,5% .

uréia podemos concluir, de acordo com os dados apresentados nos Quadros 12 e 13, que as quantidades de nitrogênio amoniacal provenientes da hidrólise da uréia corresponderiam de 13,46 a 49,70% das bases nitrogenadas voláteis totais.

Por estas razões é recomendável que se pesquise métodos mais adequados para a determinação de BNV, preferentemente, aqueles que dispensem o aquecimento.

## D. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS TRÊS MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE BNV EM PESCADO ESTOCADO EM GELO

### 1. Pescado marinho

#### a. Sardinha em filés

O estudo dos métodos para determinação de BNV com suas modificações foi aplicado ao estudo da evolução das bases nitrogenadas voláteis na estocagem de pescado em gelo. É importante repetir aqui, que para assegurar uma melhor amostragem, os peixes foram primeiramente filetados e os filés foram guardados em lotes individuais para serem retirados por ocasião das análises. O experimento não representou uma situação real, na qual os peixes são conservados inteiros ou eviscerados. O material aqui estudado era composto de filés puros.

A Figura 5, construída a partir dos dados do Quadro 14, apresenta as curvas de evolução de BNV em filés de sardinha mantidos 30 dias em gelo. Pode-se comprovar que método de Lucke & Geidel, com destilação direta do músculo, determina valores notavelmente superiores aos outros métodos. No período analisado, as três curvas apresentam zonas típicas. No início, até o 29 dia de estocagem em gelo, há uma produção súbita de BNV. No período entre o 39 e 89 dia, nota-se um patamar com valores mais ou menos constantes, para logo reiniciar o aumento que se torna acelerado após 18 dias de estocagem.

QUADRO 14. Determinação de BNV em filês de sardinha estocados em gelo.

Tempo em gelo (dias)	BNV (mg N/100 g)		
	Lucke & Geidel	IFOP	IFOP modificado
0	15,37	8,46	9,98
1	17,01	9,39	12,29
2	17,88	11,25	12,47
4	17,28	11,33	12,47
6	16,71	12,28	12,93
8	16,63	12,31	13,64
10	21,24	14,73	15,98
13	25,86	19,81	21,76
15	28,25	21,17	22,91
18	30,04	23,42	24,52
30	74,38	74,21	72,15

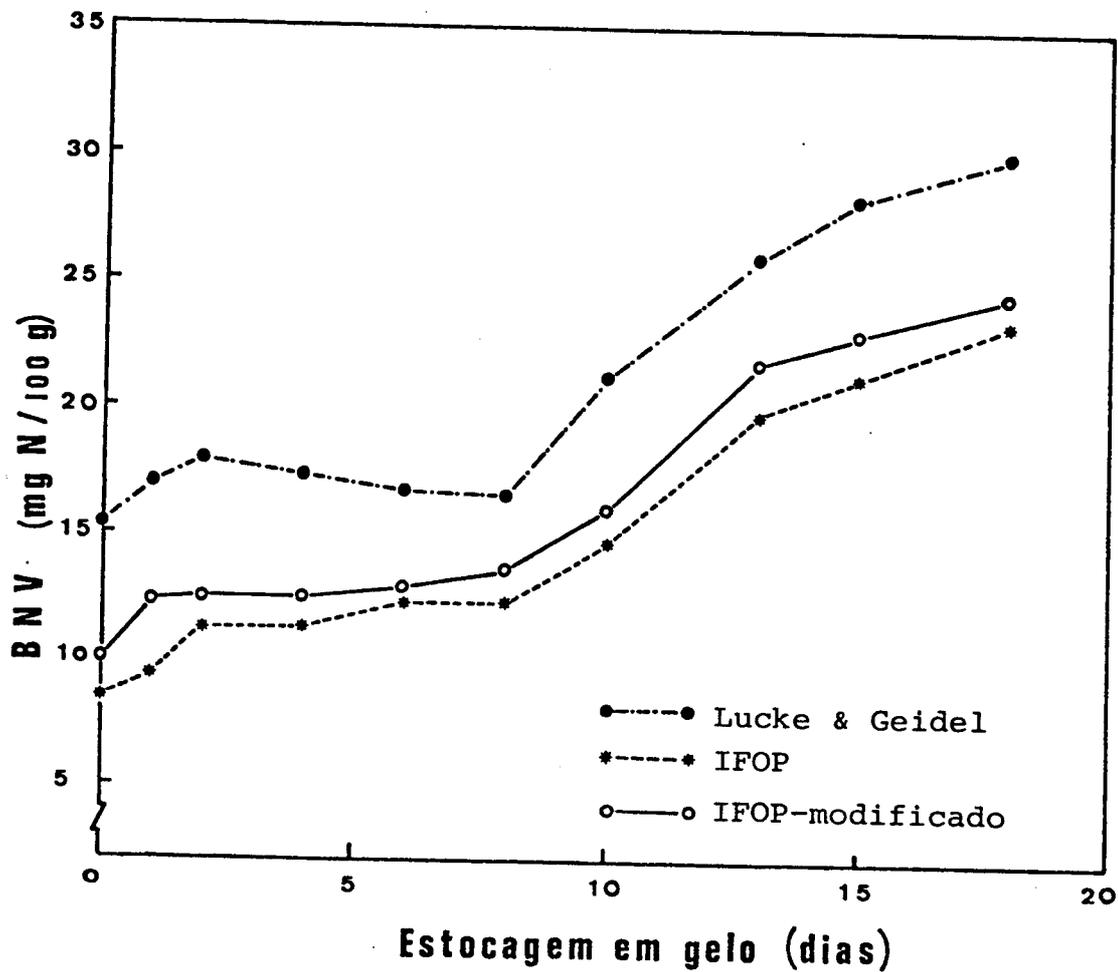


FIGURA 5. Evolução de BNV em filês de sardinha ao longo da estocagem em gelo.

O comportamento das curvas de evolução de BNV poderia ser correlacionado com as alterações da flora bacteriana ao longo da deterioração. Em pescado recém capturado, os microorganismos gram-negativos (*Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, etc) são predominantes. Na fase "lag" de crescimento há uma alteração, aonde o predomínio passa a ser dos microorganismos gram-positivos (*Micrococcus*, *Corynebacterium*, etc). Ao final da fase "lag" e durante a fase de aceleração de crescimento bacteriano, o predomínio volta a ser dos microorganismos gram-negativos que chegam a atingir, na fase exponencial, mais de 90% do total de bactérias presentes no pescado (LISTON *et alii*, 1963). Nesta fase de retomada de predomínio, enquanto *Achromobacter*, *Flavobacterium* e outras declinam em crescimento, as *Pseudomonas* predominam e chegam a constituir de 70 a 100% do total da população presente (LEE & HARRISON, 1968). A correlação se evidencia por se saber que as *Pseudomonas* são as principais responsáveis pela produção de amônia e de amins voláteis (LISTON *et alii*, 1963).

O fato mais interessante neste experimento é a comprovação de que os três métodos determinam teores diferentes de BNV, ao longo da estocagem em gelo. Tal comprovação confirma que as diferenças entre eles não são ocasionais, senão inerentes ao procedimento da análise. No método por destilação direta do músculo, há geração de amônia ou amins das proteínas, visto que os extratos desproteinizados apresentam valores mais baixos.

O valor de 30 mg N/100 g de pescado adotado como limite de aceitação do pescado fresco foi atingido em 18 dias, utilizando-se o método de Lucke & Geidel. Como nos outros métodos esse valor ainda não tinha sido alcançado, esses peixes poderiam ser consumidos. Acreditamos que, se os métodos com precipitação preliminar das proteínas vierem a ser aceitos para o controle sanitário, o valor de 30 mg deverá ser reestudado com as respectivas avaliações microbiológicas e organolépticas e, provavelmente, os resultados levarão à indicação de um valor menor.

Pode-se perceber um fato novo no Quadro 15, que apresenta as diferenças em porcentagem entre os valores de BNV determinados pelo método com destilação direta do músculo e métodos com precipitação preliminar das proteínas. Nota-se que as diferenças são máximas no início dos controles e mantêm-se ainda altas até o 4º dia. Do 6º ao 18º dia, as diferenças mantiveram-se relativamente constantes, ficando em torno de 26% entre o método de Lucke & Geidel e o do IFOP e de 20% entre o primeiro e o método modificado nesta pesquisa: entretanto, uma análise realizada após 30 dias de estocagem, quando a matéria-prima estava totalmente deteriorada, mostrou que as diferenças entre os métodos não são causadas apenas pela presença de proteínas, mas também pelo grau de deterioração do material e, em última instância, pelo acúmulo de compostos de baixo peso molecular como amônia, aminas e aminoácidos. Por esse motivo, quando o pescado se encontra em boas condições, com um baixo teor

QUADRO 15. Diferenças nos teores de BNV determinados, em filês de sardinha estocados em gelo, pelos três métodos.

Tempo em gelo (dias)	Diferenças (%)		
	A e B	A e C	C e B
0	44,96	35,07	15,23
1	44,80	27,75	23,60
2	37,09	30,26	9,78
4	34,43	27,84	9,14
6	26,51	22,62	5,03
8	25,98	17,98	9,75
10	30,65	24,76	7,82
13	23,40	15,85	8,96
15	25,06	18,90	7,59
18	22,04	18,38	4,49
30	0,23	3,00	2,86

A - método de Lucke & Geidel

B - método do IFOP

C - método IFOP modificado

de material nitrogenado não protéico, qualquer contribuição da amônia gerada das proteínas musculares na destilação (método de Lucke & Geidel) influi muito no valor de BNV. Nos estágios de deterioração avançada, a contribuição das proteínas é desprezível em comparação com o material nitrogenado não protéico e, por isso, a eliminação das proteínas pela precipitação com ácido tricloroacético ou ácido sulfúrico-sulfato de sódio não causa diferenças nos teores finais de BNV.

As diferenças entre os dois métodos que utilizam a precipitação preliminar das proteínas são pequenas apresentando, no período do 6º ao 18º dia, uma diferença média de 7,27%. Este valor representa o acréscimo de BNV que a extração sulfúrica tem em relação à extração tricloroacética e não se trata, como foi mencionado anteriormente, de um artifício criado na destilação e sim de uma melhor extração das bases pelo efeito do sal  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

## b. Sardinha inteira

A evolução de BNV durante a estocagem de sardinha inteira em gelo é mostrada na Figura 6 e Quadro 16.

As curvas da Figura 6 mostram um comportamento algo diferente em relação às curvas apresentadas para sardinha em filês. A evolução de BNV na sardinha inteira aconteceu de forma mais acelerada. Isto talvez poderia ser justificado por um estado de frescor inicial maior dos filês, mas a presença do trato intestinal e guelras no pescado inteiro com certeza propiciam um crescimento bacteriano mais acentuado.

No tocante à diferenciação entre os valores de BNV obtidos com a utilização dos três métodos de análise, o comportamento foi semelhante àquele enfatizado no ensaio com filês, ou seja, as diferenças entre os valores obtidos pelos três métodos tendem a decrescer com o aumento do tempo de estocagem em gelo.

O índice de 30 mg, determinado pelo método por destilação direta do músculo, foi atingido em 7 dias de estocagem, sendo que neste ponto o pescado já se apresentava com sinais visíveis de deterioração e impróprio para o consumo.

Na determinação de BNV, a precipitação preliminar parece ser um procedimento obrigatório. Embora não se tenha realizado testes organolépticos paralelos, estas nossas propostas se apoiam na pesquisa de ZAMBONI(1962/63) que, trabalhando com sardinha(*Sardinella brasiliensis*) estocada sob re

QUADRO 16. Determinação de BNV em sardinha inteira estocada em gelo .

Tempo em gelo (dias)	BNV (mg N/100 g)		
	Lucke & Geidel	IFOP	IFOP modificado
0	21,69	15,72	17,51
3	25,62	19,48	20,62
7	30,39	25,14	26,27
11	44,48	36,96	38,54

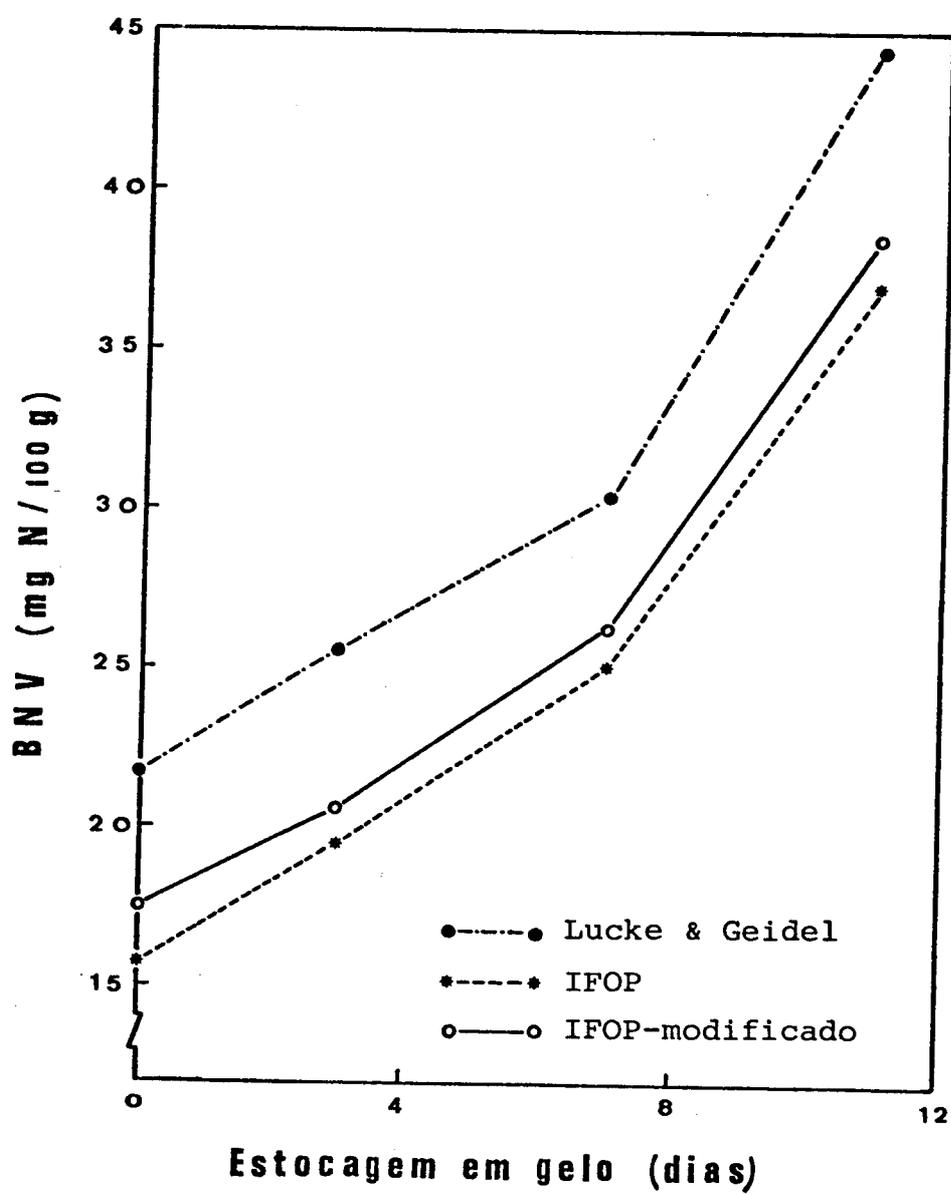


FIGURA 6. Evolução de BNV em sardinha ao longo da estocagem em gelo.

frigeração (-2 a 0°C) e utilizando a técnica de microdifusão de CONWAY & BYRNE(1933), verificou boa correlação entre o teste de BNV e os testes organolépticos .

### c. Cação em postas

A Figura 7, construída a partir dos dados do Quadro 17, apresenta as curvas de evolução de BNV em postas de cação estocadas em gelo.

As três curvas têm um comportamento semelhante e distingue-se uma primeira fase, até o 3º dia, na qual há um aumento leve no teor de BNV e segue-se uma fase quase exponencial até o 11º dia .

Constatou-se um alto índice de BNV, da ordem de 45 a 55 mg, no início da estocagem portanto, bem acima do limite permitido pela legislação brasileira . Mas este comportamento já era esperado, sabendo-se que as espécies elasmobrânqueas apresentam um alto índice de uréia.

Em trabalhos de VYNCKE (1978), com raia (*Raja clavata* L.) e WALLER (1980), com tubarão (*Galeorhinus australis*) estocados em gelo, observaram-se comportamentos semelhantes na evolução de amônia que foi determinada por uma técnica de microdifusão. Após 1 dia de captura, os teores de amônia variaram de 15 a 20 mg . Uma fase de pequeno aumento se seguiu até atingir 35 mg, para a raia estocada a 7 dias e o tubarão a 10 dias. Após esse período, o aumento no teor de amônia se deu de forma bem acelerada. A correlação com testes organolépticos levou Vyncke ao estabelecimento de uma faixa de aceitabilidade de 60 a 70 mg de nitrogênio amoniacal por 100 g de pescado correspondendo a, aproximadamente, 10 dias de estocagem em gelo .

QUADRO 17. Determinação de BNV em postas de cação  
estocadas em gelo .

Tempo em gelo (dias)	BNV (mg N/100 g)		
	Lucke & Geidel	IFOP	IFOP modificado
0	54,14	47,00	49,64
3	78,21	67,58	70,84
5	158,99	159,23	160,35
9	300,59	290,93	273,30
11	361,42	330,97	317,73

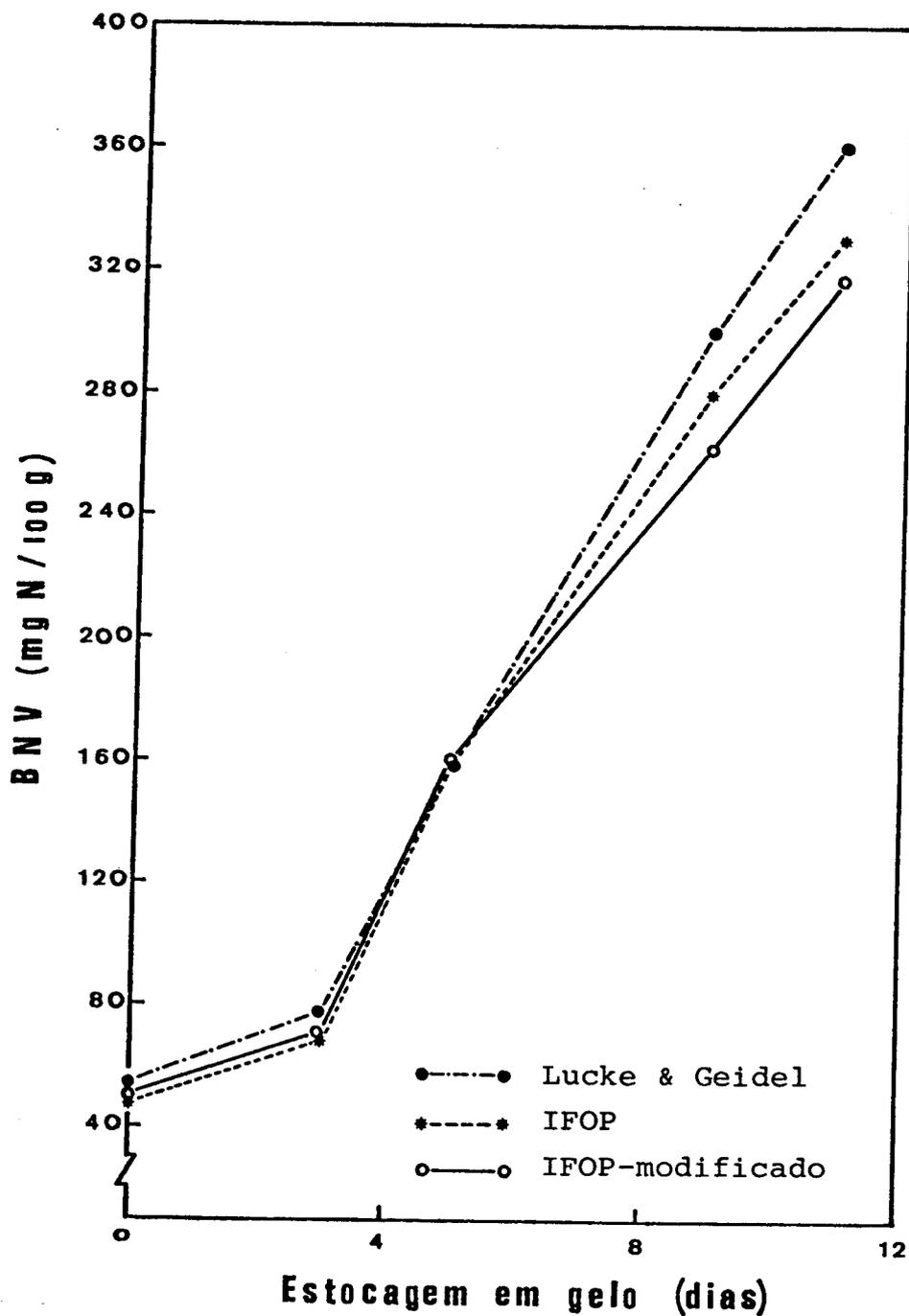


FIGURA 7. Evolução de BNV em postas de cação ao longo da estocagem em gelo.

Portanto, o estabelecimento de níveis de BNV para avaliação do grau de frescor em músculo de cação necesitaria da observação de que a presença de uréia pode gerar amônia em decorrência do método analítico e a fixação de um limite superior deve, então, incluir esse acréscimo .

## 2. Pescado de água doce

### a. Tilápia

A Figura 8 e o Quadro 18 mostram a evolução de BNV em tilápia estocada em gelo, utilizando-se os três métodos anteriormente confrontados.

O exame da curva obtida com a utilização do método convencional, de Lucke & Geidel, revela um fenômeno não discutido até agora, porém observado ocasionalmente em pescado de água doce, ou seja, o teor de BNV é maior no período de frescor absoluto, recém capturado, do que no período subsequente se bem que, após alguns dias, o teor de BNV comece a aumentar. Esse fenômeno é difícil de ser explicado visto que as bases nitrogenadas voláteis, constituídas principalmente por amônia, acumulam-se no músculo e, portanto, o seu teor deveria manter-se no mínimo constante sem nunca decrescer.

O comportamento anormal da curva de evolução de BNV também foi observado por MAIA (1980), que trabalhou com outro peixe de água doce, o curimatã (*Prochilodus scrofa*), e o autor se apoiou na hipótese de que esse decréscimo no teor de BNV poderia advir do efeito da lavagem do músculo pela água de degelo.

O fenômeno acima não se restringe somente a pescado de água doce, pois no trabalho de HILLIG *et alii* (1958) com bacalhau estocado em gelo, notou-se um decréscimo no teor de BNV do início ao 4º dia de estocagem. Nesse experimento foi

QUADRO 18. Determinação de BNV em tilápias estocadas em gelo.

Tempo em gelo (dias)	BNV (mg N/100 g)		
	Lucke & Geidel	IFOP	IFOP modificado
0	21,32	8,46	13,38
1	19,26	9,71	14,09
3	17,45	12,20	14,87
5	16,05	12,39	14,89
8	16,44	12,53	15,00
11	17,79	13,21	17,03
15	21,67	16,84	19,64
21	32,56	28,64	29,35

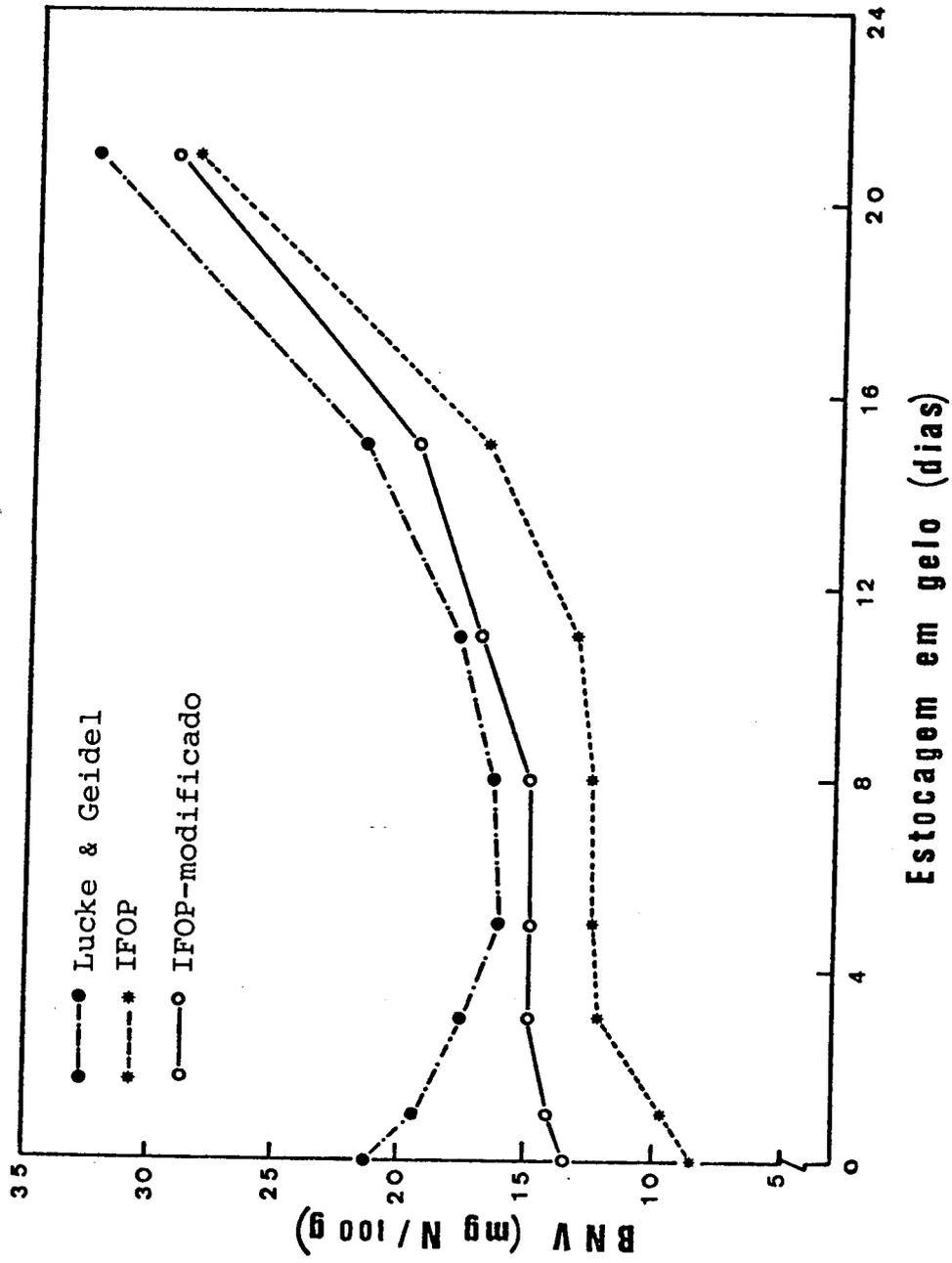


FIGURA 8. Evolução de BNV em tilápia ao longo da estocagem em gelo .

utilizado um método com destilação direta do músculo.

Acreditamos que o comportamento anormal se deve a um artifício criado pelo processo de destilação quando se emprega o músculo diretamente. Provavelmente, nos períodos iniciais de estocagem em gelo, os sistemas enzimáticos do músculo (possivelmente desaminases e eventualmente urease) estão ainda ativos e, num curto lapso de tempo, desde a temperatura ambiente até a ebulição, essas enzimas conseguem desaminar aminoácidos ou hidrolisar uréia, aumentando o teor de BNV. Já que tais sistemas enzimáticos são bastante lábeis ao curso de um par de dias, podem perder sua atividade e não influir mais no teste . Esta explicação se apoia no fato de que os métodos que utilizaram a precipitação preliminar das proteínas e, portanto, inativação de enzimas, determinaram teores de BNV sempre crescentes como revelam as curvas da Figura 8 .

A sugestão de se usar a precipitação preliminar de proteínas encontra respaldo quando constatamos que a utilização da técnica de microdifusão, com precipitação com ácido tricloroacético, propicia dados de BNV sempre crescentes. Este fato foi verificado em trabalhos realizados com peixes de água doce por LAHIRY *et alii* (1963) com *Barbus dubious*, por MOORJANI *et alii* (1958) com *Barbus carnaticus*, por DOKE *et alii* (1979) com *Tilapia mossambica* e, em peixes marinhos por MENDES (1974) com corvina (*Micropogon furnieri*), robalo (*Centropomus undecimalis*), castanha (*Umbrina canosai*) e pescada amarela (*Cysnacion acoupa*) .

Provavelmente em nossos ensaios com outras es  
pécies não foi notado o fenômeno da inflexão da curva de ev  
lução de BNV, quando aplicado o método convencional, porque os  
peixes já tinham um certo tempo de estocagem após a captura ,  
acima de 5 dias, de modo que essa fase já teria se passado.

Os três aspectos já observados nos testes com  
sardinha foram também constatados neste teste com tilápia :

- a) O método por destilação direta do músculo propiciou a  
obtenção de teores de BNV superiores aos outros mét  
dos .
- b) Os valores de BNV encontrados quando se utilizou o ex  
trato sulfúrico foram levemente superiores aos obtidos  
com o extrato tricloroacético.
- c) Para todos os métodos, as curvas de BNV apresentaram  
uma zona de quase constância localizada entre o 3º e  
8º dia de estocagem da tilápia em gelo. Logo após esse  
período, o teor de BNV começou a subir, porém a incli  
nação da curva não é tão acentuada quanto aquela obser  
vada com sardinha. Este fato pode ser explicado pela  
ausência de óxido de trimetilamina ou pela menor susce  
tibilidade de se gerar amônia nestas espécies. A deter  
minação de BNV é pouco recomendável para avaliação do  
grau de frescor em peixes de água doce.

### b. Curimatã eviscerado

A evolução de BNV em curimatã eviscerado, es tocado em gelo por 11 dias, é apresentada na Figura 9 e no Quadro 19 .

As curvas apresentadas na Figura 9 denotam um comportamento semelhante para os três métodos utilizados. No tou-se um decréscimo no teor de BNV até o 4º dia para logo au mentar levemente até o 11º dia de estocagem. Esse comportamento diferenciado e com valores bem inferiores àqueles obtidos por MAIA (1980) deveu-se possivelmente ao processo de conge lamento que a matéria-prima teria sofrido antes da estocagem em gelo. Provavelmente, a exsudação de líquido com o desconge lamento tenha arrastado compostos nitrogenados bem como enzi mas hidrolíticas.

A hipótese acima baseia-se no trabalho de DOKE *et alii* (1979) que constataram que a maior fonte de atividade hidrolítica em peixe marinho, *Harpodon nehereus*, estava con tida essencialmente no "drip", enquanto que em peixe de água doce, *Tilapia mossambica*, estava contida na pele.

Embora tenha atingido um nível máximo de BNV de 20,65 mg , após 11 dias, o pescado apresentava-se visivel mente deteriorado.

Em vista das observações acima, poderíamos di zer que a determinação de BNV talvez não possa ser aplicada a peixes submetidos ao congelamento prévio e logo estocados em gelo para sua comercialização . Pode-se sugerir que estudos

QUADRO 19. Determinação de BNV em curimatã eviscerado estocado em gelo.

Tempo em dias (dias)	BNV (mg N/100 g)		
	Lucke & Geidel	IFOP	IFOP modificado
0	18,52	13,86	15,19
4	16,49	11,14	13,05
7	17,98	16,20	17,09
11	20,65	17,13	17,81

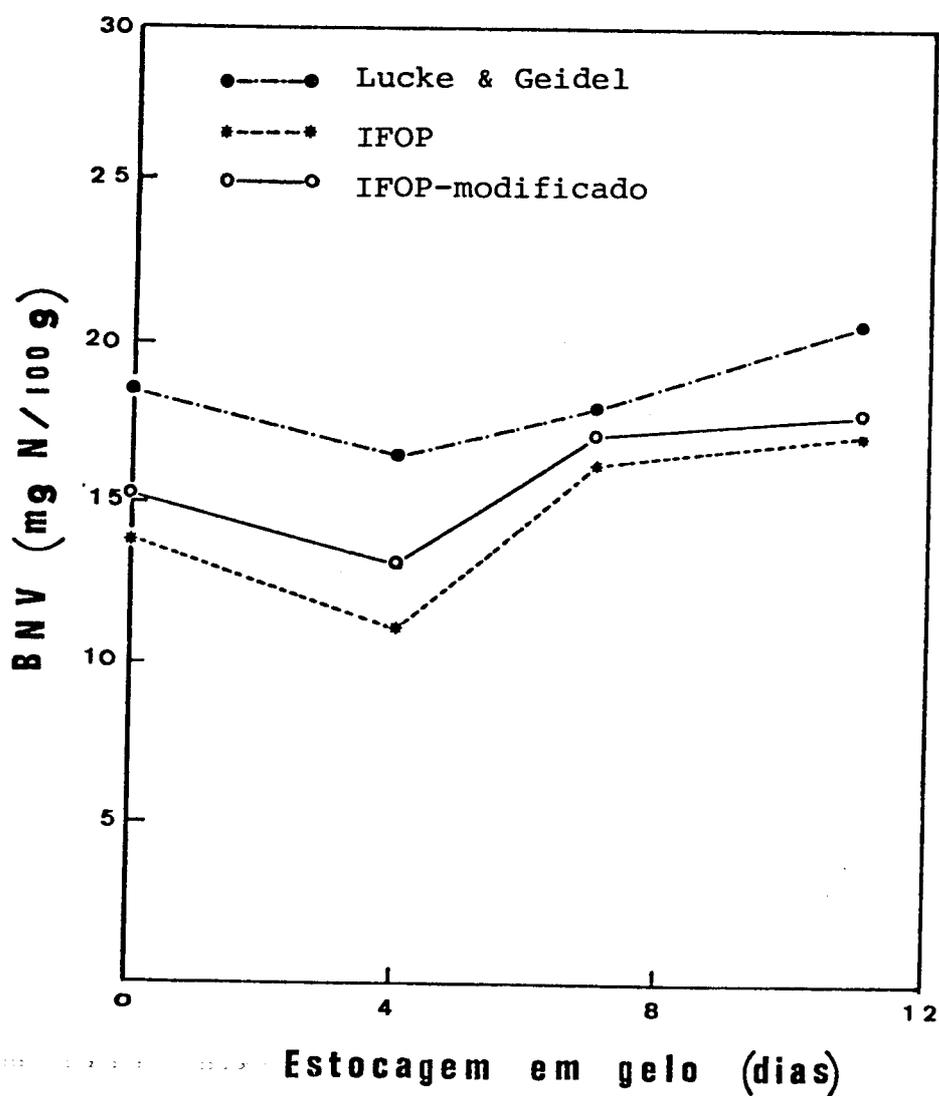


FIGURA 9. Evolução de BNV em curimatã eviscerado ao longo da estocagem em gelo.

possam ser realizados no sentido de se verificar a correlação entre a determinação de BNV e o efeito da exsudação de líquido pelo descongelamento.

De qualquer forma, o objetivo principal deste experimento , que consistiu em verificar se os três métodos mantinham as diferenças observadas com os outros peixes, foi atingido .

## V. CONCLUSÕES

1. A determinação de BNV em pescado pelo método de Lucke & Geidel tem pouca reprodutibilidade analítica e os resultados são notavelmente maiores (22%) em relação aos obtidos pelo método do IFOP.
2. No método de Lucke & Geidel é mais conveniente recolher-se uma quantidade fixa de destilado (150 mL), que obedecer um tempo de destilação pré-fixado (25 minutos).
3. A solução de ácido sulfúrico 2,5%-sulfato de sódio 7,5% pode ser empregada como agente precipitante de proteínas em substituição ao ácido tricloroacético 5% .
4. A substituição de óxido de magnésio por solução saturada de Borax é plenamente viável, dando resultados similares.
5. Para deslocar as BNV, durante a destilação, não é conveniente usar alcalinizantes que apresentem valores de pH superiores a 10,5 .
6. A presença de uréia no músculo de pescado aumenta o teor original de BNV, devido à hidrólise que se processa durante a destilação em meio alcalino.
7. A determinação de BNV para avaliação do grau de deterioração é pouco sensível em pescados de água doce, não se detectando mudanças importantes mesmo após vários dias de estocagem em gelo.

8. A precipitação preliminar das proteínas antes da determi  
nação analítica é uma medida imprescindível para minimi  
zar o acréscimo no teor de BNV por efeito do aquecimento  
em meio alcalino .

## VI. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1. Estudo da aplicação do método para determinação de BNV em pescado que tenha sido submetido ao processo de descongelamento, pois verifica-se uma notável diminuição no teor de BNV, provavelmente pelo arraste de compostos nitrogenados voláteis no líquido exsudado.
2. Estabelecimento de limites realistas de BNV em algumas espécies brasileiras de interesse comercial, baseados na correlação dos ensaios físicos, químicos e organolépticos levando-se em consideração as modificações aqui propostas.
3. Desenvolvimento de novos métodos para determinação de bases nitrogenadas totais, inclusive compostos básicos não voláteis que dispensem o aquecimento dos extratos de pescado.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. ANTONACOPOULOS, N. - Reconocimiento químico-bromatológico y calificación del pescado y sus productos. In: LUDORF, W. & MEYER, V. El pescado y los productos de la pesca; trad. de Jaime Esain Escobar. 2.ed. Zaragoza, Editorial Acríbia, 1973. p. 201-230.
2. \_\_\_\_\_. - Métodos sensoriales y químicos de reconocimiento. In: LUDORF, W. & MEYER, V. El pescado y los productos de la pesca; trad. de Jaime Esain Escobar. 2.ed. Zaragoza, Editorial Acríbia, 1973. p. 231-275.
3. BALDWIN, E. - Excretory metabolism of the amino-acids. In: \_\_\_\_\_. Dynamic aspects of biochemistry. 5.ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1967. p. 263-289.
4. BILLON, J.; OLLIEUZ, N.; TAO, S. H. - Etude d'une nouvelle méthode de dosage de l'azote basique volatil total (ABVT) pour l'évaluation qualitative des produits de la pêche. Revue Technique Veterinaire de L'alimentation, 18 (149): 13-17, 1979.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura. - Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, DIPOA, 1974. 364p.

6. CASTRO, L. A. B. - Lavagem da trimetilamina (TMA) pela água de fusão do gelo utilizado na conservação do camarão sete barbas ( *xíphopeneus kroyeri* ). Boletim do Instituto de Pesca, 4 (2): 29-36, 1975.
7. CATTANEO, P.; PAGLIARO, V.; CANTONI, C. - Ipoxantina e stato di freschezza delle carni. Industrie Alimentari, 18 (159): 222-226, 1979.
8. CHEUK, W. L.; FINNE, G.; NICKELSON II, R. - Stability of adenosine deaminase and adenosine monophosphate deaminase during ice storage of pink and brown shrimp from the gulf of Mexico. Journal of Food Science, 44: 1625-1628, 1979.
9. COBB III, B. F.; ALANIZ, I.; THOMPSON Jr., C. A. - Biochemical and microbial studies on shrimp: volatile nitrogen and amino nitrogen analysis. Journal of Food Science, 38: 431-436, 1973.
10. \_\_\_\_\_ & VANDERZANT, C. - Development of chemical test for shrimp quality. Journal of Food Science, 40: 121-124, 1975.
11. CONNELL, J. J. - Methods of assessing and selecting for quality. In: \_\_\_\_\_. Control of fish quality. Surrey, Fishing News (Books) Ltd, 1975. p. 107-132.

12. CONWAY, E. J. & BYRNE, A. - An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. I. The micro-determination of ammonia. The Biochemical Journal, 27: 419-429, 1933.
13. DOKE, S. N.; WARRIER, S. B. K.; NINJOOR, V.; NADKARNI, G. B. - Role of hidrolytic enzymes in the spoilage of fish. Journal of Food Science and Technology, 16 (6): 223-226, 1979.
14. FARBER, L. & FERRO, M. - Volatile reducing substances (VRS) and volatile nitrogen compounds in relation to spoilage in canned fish. Food Technology, 10 (7): 303-304, 1956.
15. \_\_\_\_\_. - Freshness tests. In: BORGSTROM, G., ed. Fish as food. New York, Academic Press Inc, 1965. v.4, p. 65-126.
16. FLICK, G. J. & LOVELL, R. T. - Post-mortem biochemical changes in the muscle of gulf shrimp, *Penaeus aztecus*. Journal of Food Science, 37: 609-611, 1972.
17. FRAZIER, W. C. - Contaminación, conservación y alteraciones del pescado y otros productos marinhos. In: \_\_\_\_\_. Microbiología de los alimentos; trad. de Victoria

Medarde Agustin. 2.ed. Zaragoza, Editorial Acribia, 1976. p. 280-291.

18. GAGNON, M. & FELLERS, C. R. - Biochemical methods for determining shrimp quality. I. Study of analytical methods. Food Technology, 12 (7): 340-343, 1958.
19. GIANNINI, D. H.; DAVIDOVICH, L. A.; LUPIN, H. M. - Adaptación de métodos de uso comercial para la determinación de nitrógeno básico volátil en merluza ( *Merluccius hubbsi* ). Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 19 (1): 55-60, 1979.
20. HILLIG, F.; SHELTON Jr., L. R.; LOUGHREY, J. H.; EISNER, J. - Chemical indices of decomposition in cod. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, 41 (4): 763-775, 1958.
21. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. São Paulo. - Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 1976. v.1.
22. JONES, N. R. - Fish flavours. In: SCHULTZ, H. W. ed. - Symposium on foods: the chemistry and physiology of flavours. Westport, AVI, 1967. p. 267-295.
23. KASSEMSARN, B.; PEREZ, B. S.; MURRAY, J.; JONES, N. R. -

- Nucleotide degradation in the muscle of iced haddock (*Gadus aeglefinus*), lemon sole (*Pleuronectes microcephalus*), and plaice (*Pleuronectes platessa*). Journal of Food Science, 28: 28-37, 1965.
24. LAHIRY, N. L.; MOORJANI, M. N.; BALIGA, B. R. - Factors influencing the keeping quality of fresh-water fish in ice. Food Technology, 17 (9): 123-125, 1963.
25. LASZLO, H. - Controle sanitário do pescado e derivados. Revista Nacional da Pesca, 17 (147): 18-24, 1975.
26. LEE, J. S. & HARRISON, J. M. - Microbial flora of pacific hake (*Merluccius productus*). Applied Microbiology, 16 (12): 1937-1938, 1968.
27. LEITÃO, M. F. F. - Microbiologia do pescado e controle sanitário no processamento. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 14 (50): 1-35, 1977.
28. LISTON, J.; STANSBY, M. E.; OLCOTT, H. J. - Bacteriological and chemical basis for deteriorative changes. In: STANSBY, M. E. Industrial fishery technology: a survey of methods for domestic harvesting, preservation, and processing of fish used for food and for industrial products. New York, Reinhold, 1963. p. 350-361.

29. LUDORF, W. & MEYER, V. - El pescado como alimento. In: \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. El pescado y los productos de la pesca; trad. de Jaime Esain Escobar. 2.ed. Zaragoza, Editorial Acribia, 1973. p. 74-100.
30. LUPIN, H. M. & TRUCCO, R. - Variacion en el contenido de nitrógeno volátil ( NBV ) durante el procesamiento de pescado salado y conservas. Industria Conservera, 44 (466): 205-207, 1978.
31. MAIA, E. L. - Composição, conservação e utilização do curimatã (*Prochilodus scrofa*, Steindachner, 1881). Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 1980. 130p. Tese ( Mestr. ) - Universidade Estadual de Campinas.
32. MARTIN, R. E.; GRAY, R. J. H.; PIERSON, M. O. - Quality assessment of fresh fish and the role of the naturally occurring microflora. Food Technology, 32 (5): 188-198, 1978.
33. MENDES, M. H. M. - Evolução das bases voláteis totais e da trimetilamina em pescados e o seu uso como indicador de qualidade. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmaceuticas, 1974. 63p. Tese ( Mestr. ) -Universidade de São Paulo.

34. MOORJANI, M. N.; IYENGAR, J. R.; VISWESWARIAH, K.; BHATIA, D. S.; SUBRAHMANYAN, V. - Changes in the total volatile base, volatile reducing substances and bacterial count as indices of fresh water fish spoilage. Food Technology, 12 (8): 385-386, 1958.
35. MORGA, A. A. - Avaliação do índice de frescor da pescada foguete ( *Macrodon ancylodon* ) conservada em gelo. Campinas, Faculdade de Tecnologia de Alimentos, 1975. 80p. Tese ( Mestr. ) - Universidade Estadual de Campinas.
36. NELSON, J. S. - Fishes of the world. New York, John Wiley & Sons, 1976. p. 29-38.
37. OSTLE, B. - Statistics in research. 2.ed. Ames, Iowa State University Press, 1963. 585p.
38. PEARSON, D. - Flesh foods: table jellies. In: \_\_\_\_\_. The chemical analysis of foods. 7.ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1976. p. 386-387.
39. PEDRAJA, R. R. - Change of composition of shrimp and other marine animals during processing. Food Technology, 24 (12): 1355-1360, 1970.

40. \_\_\_\_\_. - Quality aspects of refrigerated and frozen fishery products. ASHRAE Journal, Nov. 1972.
41. REPOSI, J. - Estudio preliminar sobre los gases toxicos producidos durante la descomposicion del pescado en la industria de harina. Santiago, Instituto de Fomento Pesqueiro, 1968. 17p. (Publicacion, n. 38)
42. RITSKES, T. M. - The gas chromatographic determination of trimethylamine and dimethylamine in fish, fishery products and other foodstuffs. Journal of Food Technology, 10: 221-228, 1975.
43. SHEWAN, J. M.; GIBSON, D. M.; MURRAY, C. K. - The estimation of trimethylamine in fish muscle. In: KREUZER, R., ed. Fish inspection and quality control. London, Fishing News (Books) Ltd., 1971. p. 183-186.
44. SIEBERT, G. - Enzymes of marine fish muscle and their role in fish spoilage. In: HEEN, E. & KREUZER, R., ed. Fish in nutrition. London, Fishing News (Books) Ltd., 1962. p. 80-82.
45. SIMIDU, W. - Nonprotein nitrogenous compounds. In BORSTROM, G., ed. Fish as food. London, Academic Press Inc. 1961. v.1, p. 353-384.

46. STANSBY, M. E.; HARRISON, R. W.; DASSOW, J.; SATER, M. -  
Determining volatile bases in fish: comparison of precision of certain methods. Industrial and Engineering Chemistry, 16 (9): 593-596, 1944.
47. STONE, F. E. - Enzymatic deamination of adenosine monophosphate ( AMP ), adenosine and adenine by salmon, crab and scallop muscle extracts. Journal of Food Science, 35: 565-567, 1970.
48. \_\_\_\_\_. - Inosine monophosphate ( IMP ) and hypoxanthine formation in three species of shrimp held on ice. Journal of Milk and Food Technology, 34 (7): 354-356, 1971.
49. TOMIYAMA, T.; COSTA, A. A.; STERN, J. A. - A rapid vacuum distillation procedure for the determination of volatile acids and volatile bases in fish flesh. Food Technology, 10 (12): 614-617, 1956.
50. TOMIYASU, Y. & ZENITANI, B. - Spoilage of fish and its preservation by chemical agents. Advances in Food Research, 7: 42-82, 1957.
51. VYNCKE, W. - Determination of ammonia in dressed thornback ray ( *Raja clavata* L. ) as a quality test. Journal of

Food Technology, 13: 37-44, 1978.

52. WALLER, P. F. - Spoilage and spoilage indicators in shark held in ice. Food Technology in Australia, 32 (3): 161-166, 1980.
53. YEH, C. S.; NICKELSON II, R.; FINNE, G. Ammonia-producing enzymes in white shrimp tails. Journal of Food Science, 43 (5): 1400-1404, 1978.
54. ZAITSEV, V.; KIZEVETTER, I.; LAGUNOV, L.; MAKAROVA, T.; MINDER, L.; PODSEVALOV, V. - Characteristics of fish as a raw material for industry. In: \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Fish curing and processing; trad. de A. de Merindol. Moscow, Mir Publishers, 1969. p. 17-97.
55. ZAMBONI, C. Q. - Verificação da deterioração da sardinha ( *Sardinella aurita* ) por microdifusão ( método de Conway ). Revista do Instituto Adolfo Lutz, (22/23): 73-76, 1962/1963.