

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por Claudio Chaves Amanajás e aprovada pela Comissão Julgadora em 06.12.85.
Campinas, 06 de dezembro de 1985

Quiterias

Presidente da Banca

DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BÁSICOS TOTAIS

DE PESCADO E O SEU POTENCIAL PARA

AValiação DO FRESCOR.

Claudio Chaves Amanajás
Químico Industrial

23/85

Prof. Dr. Emílio S. Contreras Guzmán
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

1985

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Wilson Pedrosa Amanajás e Hilda C. Amanajás, que não mediram esforços nem sacrifícios para incentivar-me no interesse pelo saber.

À minha querida esposa, Maria Amélia Russo Amanajás, pela presença constante, amor, compreensão e incentivo, que foram fatores determinantes no desenvolvimento desta pesquisa.

Amélia e eu dedicamos este trabalho às queridas filhas Ludmilla e Tatianna, e ao nosso bebê que está por vir, na graça de Deus.

.o AGRADECIMENTOS o.

- O autor expressa seus agradecimentos ao Profes sor Dr. Emílio S. Contreras Guzmán, pela orien tação, amizade, dedicação e elevado espírito de responsabilidade no desenvolvimento deste trabalho.
- A Direção da Faculdade de Engenharia de Alimen tos, da Universidade Estadual de Campinas.
- Ao Departamento de Operações e Processos Quími cos, da Universidade Federal do Pará, por ter permitido seu afastamento.
- A Associação Brasileira das Indústrias de Ali- mentação (ABIA), pelo patrocínio das cópias e capas deste trabalho.
- Ao dileto amigo Daniel Barrera Arellano, pelo companheirismo, boa vontade, sempre solidário em todos os momentos.
- Ao pessoal de apoio dos laboratórios de Servi cos de Alimentação e Bioquímica Nutricional (FEA - UNICAMP), representados na pessoa da a- miga Cristina Boccato Ferreira, e a todos aque- les que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Assunto	Página
ÍNDICE DE QUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Nitrogênio não Protéico dos Pescados (NNP)	4
2.1.1. Degradação de Nucleotídeos como Fonte de Amônia	7
2.1.2. Aminoácidos Livres e Peptídios Musculares e sua Contribuição na Formação de Amônia	10
2.1.2.a. Aminoácidos não Protéicos e Peptídios	10
2.1.2.b. Aminoácidos Livres de Origem Protéica	12
2.1.2.c. Degradação Geral dos Aminoácidos	13
2.1.2.d. Formação de Aminas e Compostos relacionados	15

Assunto	Página
2.2. Métodos Químicos e Físicos em Conexão com a Determinação das Bases Totais (BT)	18
2.2.1. Determinação das Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV)	19
2.2.2. Determinação da Capacidade Tampão de Músculo Pescado durante a Deterioração	20
2.2.3. Evolução do pH durante a Deterioração	21
III. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Materiais	23
3.1.1. Peixes	23
3.1.2. Reagentes	23
3.1.3. Aparelhos	24
3.2. Métodos	24
3.2.1. Preparo das Amostras para Análise	24
3.2.2. Extrações	25
3.2.3. Análises Químicas	26
3.2.3.a. Nitrogênio Não-Protéico (NNP)	26
3.2.3.b. Trimetilamina (TMA)	26
3.2.3.c. Bases Voláteis (BV)	27
3.2.3.d. Bases Totais (BT)	27
- Determinação das BT nos Extratos I e IV	27
- Determinação de BT no Extrato VI	28
- Determinação de BT no Extrato VII (Método Rápido)	28

Assunto	Página
3.2.4. Estimativa do Volume Total da Fração Lí- quida e da Concentração de Peixe por mL	28
3.2.5. Ensaio de Recuperação de Amônia adicio- nada como NH_4Cl , para avaliar a Eficiên- cia do ZnO , MgO e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na liberação do Nitrogênio Básico	31
3.2.6. Influência da Percentagem de Água do Eta- nol no Valor das BT	32
3.2.7. Influência da Quantidade de MgO ou $\text{Ca}(\text{OH})_2$ no Valor das BT	33
3.2.8. Influência do Tempo de Agitação do Alca- linizante no Valor das BT	33
3.2.9. Estudo de Composição dos Extratos por Cromatografia de Troca Iônica e Reação com Ninidrina	33
3.2.10. Evolução das Bases Totais e das Bases Vo- láteis	34
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1. Ensaio de Extração por Solventes	36
4.2. Liberação das Substâncias Básicas por Alcalis Sólidos	38
4.3. Avaliação da Eficiência da Extração e da Libera- ção das BT	40

Assunto	Página
4.4. Influência da Percentagem de Água do Etanol no Valor das BT	42
4.5. Influência da Quantidade de Alcalinizante no <u>Valor</u> das BT	44
4.6. Influência do Tempo de Contato (Agitação) do <u>Alcalinizante</u> no Valor das BT	44
4.7. Modificação do Processo para Redução das Etapas Analíticas	47
4.8. Estudos Preliminares sobre Composição do Extrato das BT	48
4.9. Evolução das BT e das BV em Peixes Armazenados com Gelo	57
V. CONCLUSÕES	66
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE QUADROS

Nº	Título	Página
01	- Extratos usados para pesquisa sobre determinação de Bases Totais.	25
02	- Valores da fração líquida em peso e volume e concentração de peixe (g/mL), para os diversos solventes usados na extração de músculos de pescado.	30
03	- Teores de Nitrogênio Não Protéico, N-TMA e Bases Voláteis em extratos de sardinha (<i>Sardinella aurita</i>), obtidos com diferentes solventes (valores em duplicatas).	37
04	- Basicidade total dos extratos I e IV de sardinha (em mL de HCl 0,02N/10 mL do extrato), obtida com diversos alcalinizantes sólidos.	39
05	- Recuperação de N básico adicionado na forma de NH_4Cl e alcalinizado com NaOH, ZnO, MgO e $\text{Ca}(\text{OH})_2$. A basicidade (em duplicata) está expressa em mL de HCl 0,02N.	41

Nº	Título	Página
06	- Comparação entre a determinação de BT em extratos de peixes, pelo método: (extração + liberação) → (titulação) e pelo método (extração) → (liberação) → (titulação). Alcalinizante: Ca(OH)_2 .	48
07	- Teores de N-de aminoácidos e N-de amônia (em microgramas) contidos em 1.000 microgramas de N não protéico, de extratos de pescado, obtidos por extração e liberação das bases totais com Ca(OH)_2 .	50
08	- Relações percentuais entre N-amoniacal (NA), N não protéico injetado na coluna (NNP), soma do N de aminoácidos (NAA), soma do N reagido com a ninidrina (SNN), N da histidina (NH) e N-TMA nos extratos etanólicos (IV) de diversos pescados.	52
09	- Evolução das BT e das BV em tilápia híbrida (cruzamento de <u>Tilápia hornorum</u> (macho) com <u>T. nilótica</u> (fêmea) e corimbata (<i>Prochilodus reticulatus</i>), estocados em gelo.	57
10	- Evolução das BT e das BV em sardinha inteira (<u>Sardinella aurita</u>) estocada em gelo, e filé de sardinha em embalagem plástica mergulhada em gelo.	59

Nº	Título	Página
11	- Evolução das BT e das BV em cavalinha inteira (<i>Scomber scombrus</i>) estocada em gelo, e filê de cavalinha em embalagem plástica mergulhada em gelo.	59
12	- Evolução das BT e das BV em pescada (<i>Macrodon angulodon</i>) e corvina (<i>Micropogon furnieri</i>) estocadas em gelo.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Título	Página
01	- Degradação do ATP no músculo de pe ^s cado ap ^o s a morte (IDEKA, 1980; SPINELLI, 1971 e BURT, 1977).	8
02	- Hidr ^o lise da creatina.	11
03	- Forma ^ç ão de am ^o nia e a ^m inas a partir de a ^m ino ^a cidos.	13
04	- Forma ^ç ão de TMA e DMA em pescados.	16
05	- Forma ^ç ão de a ^m inas superiores por de ^g rad ^a ção de a ^m i ⁿ o ^a cidos.	17
06	- Forma ^ç ão de bases heteroc ⁱ clicas em m ^u sculos de pe ⁱ xes durante a estocagem refrigerada.	18
07	- Influ ^ê ncia do teor de ^a gua do etanol na quantidade de subst ^a ncias b ^a sicas liberadas por agita ^ç ão com Ca(OH)_2 .	43
08	- Determina ^ç ão da quantidade m ⁱ nima de alcalinizante para libera ^ç ão das subst ^a ncias b ^a sicas (BT) do ex- trato triclorac ^e tico e etan ^o lico.	45

Nº	Título	Página
09	- Influência do tempo de agitação na quantidade de substâncias básicas liberadas com Ca(OH)_2 e MgO .	46
10	- Separação dos compostos que reagem com ninidrina por cromatografia de troca iônica no aparelho analisador de aminoácidos.	55
11	- Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de tilápia híbrida (cruzamento de tilápia hornorum macho com tilápia nilótica fêmea) e corimbatã.	58
12	- Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de sardinha armazenada em gelo.	60
13	- Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de cavallinha armazenada em gelo.	61
14	- Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de pescada e corvina armazenadas em gelo.	63

RESUMO

A presente pesquisa relata as condições analíticas e as aplicações de um novo método químico para avaliação do estado de frescor de pescados. O método foi denominado de Bases Totais (BT) para diferenciá-lo do teste convencional das Bases Voláteis (BV).

Nos testes para o desenvolvimento do método, foram usadas as seguintes espécies: sardinha (*Sardinella aurita*), cavalinha (*Scomber scombrus*), corvina (*Micropogon furnieri*), pescada-foguete (*Macrondon ancylodon*), corimbata (*Prochilodus reticulatus*) e tilápia-híbrida (cruzamento de honorum macho e nilótica fêmea).

A determinação consiste na extração seletiva dos compostos nitrogenados básicos totais de músculo de peixes com etanol absoluto e Ca(OH)_2 sólido na relação de 1:3:0,08 (peixe:etanol: Ca(OH)_2). A mistura, após homogeneização e filtração, fornece um extrato contendo as bases totais no estado livre que podem ser tituladas diretamente com HCl.

A escolha do etanol absoluto e Ca(OH)_2 foi baseada em estudos com diversos solventes e álcalis sólidos, a fim de obter extratos com um teor mínimo de substâncias anfóteras que interferem na visualização do ponto final da titulação. A eficiência da extração com etanol e Ca(OH)_2 foi comprovada pela recuperação quantitativa do N de NH_4Cl , adicionado ao pescado, e também pelos teores de trimetilamina e Bases Voláteis (BV), determinados, comparativamente, por métodos independentes.

A identificação dos compostos individuais das BT foi abordada, preliminarmente, determinando os compostos que reagem com ninidri-

na. Foi estabelecido que na sardinha 70,9% do N, do extrato, corresponde à amônia e compostos contendo grupos amino primários, assim distribuídos: 47,6% de N de histidina, 10,8% de N amoniacal e 12,6% de N de outros aminoácidos, particularmente lisina, alanina e glicina. Na corvina e pescada, apenas 37,2 e 43,2% do N reagiram com ninidrina, sendo que 25,1 e 32,3% eram de origem amoniacal, respectivamente. Nestes peixes, a contribuição do N da histidina foi inferior a 2% e o N de outros aminoácidos livres perfizeram 10,3% na corvina e 9,1% na pescada. No corimbata, 36,2% do N reagiu com ninidrina, estando constituído por 12,2% de N amoniacal; 10,0% de N da histidina e 14% restante foram feitos por outros aminoácidos.

A dosagem das BT, em estudos de armazenagem de pescado com gelo, foi realizada em forma simultânea com a dosagem das BV. Em sardinha, cavalinha e tilápia, armazenadas por treze dias, as curvas das BT apresentaram uma inclinação maior que as respectivas das BV, acusando, de forma mais nítida, o avanço da deterioração. Em corimbata, a evolução de ambos os testes foi quase que semelhante; e na corvina e pescada, as curvas das BT foram menos demonstrativas da perda de frescor que as BV.

Os valores de BT de pescados frescos encontram-se entre 20 e 50 mg de N-BT/100 g. Após duas semanas em gelo, estes valores podem se elevar acima de 100 mg de N-BT/100 g.

SUMMARY

This research reports the analytical conditions and application of a new chemical method for the estimation of the freshness of fish. It has been given the name "Total Bases" (TB) to differentiate it from the conventional test for Volatile Bases (VB).

The development of the present method was performed with the following species: sardine (*Sardinella aurita*), mackerel (*Scomber scombrus*), croacker (*Micropogon furnieri*), weakfish (*Machodon ancylodon*), corimbata (*Prochilodus reticulatus*) and hybrid-tilapia (*Oreochromis nilotica*).

The determination consists of a selective extraction of nitrogenous basic compounds from fish muscle with absolute ethanol and solid $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in the ratio: 1:3:0.08 (fish:ethanol: $\text{Ca}(\text{OH})_2$). The mixture is homogenized and filtered, providing an extract with the basic compounds in the free state so that they may be titrated directly with HCl.

The choice of absolute ethanol and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ was based on tests with several solvents and solid alkalis to obtain an extract with a minimum of amphoteric substances that interfere with the end point of the titration.

The efficiency of the ethanolic - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ extraction was demonstrated by the quantitative recovery of the N from NH_4Cl added to the fish sample and also by the content of trimethylamine and other volatile bases determined for comparison by independent methods.

Identification of individual compounds in the TB extracts was

first by determining which compounds react with ninhydrin. It was established that, in the extracts of sardine, 70.9% of the N corresponded to ammonia and primary NH_2 -containing compounds. This value was made up of 47.6% of N from histidine, 10.8% of N from NH_3 and 12.6% of N from other amino acids, mainly lysine, alanine and glycine. In the extracts of croaker and weakfish, only 37.2 and 43.2% of N, respectively, reacted with ninhydrin, being made up of 25.1 and 32.3% of N from NH_3 . Corimbata extracts had 36.2% of ninhydrin-reacting N, consisting of 12.2% NH_3 N, 10.0% histidine N. The remaining 14% was from other amino acids.

The TB method was applied to studies of storage of iced fish using also the VB method for comparison. Experiments with sardine, mackerel and tilapia for 13 days showed that curves for TB had a greater slope than the respective curves for VB, indicating more clearly the progress of the spoilage. In corimbata the changes of both tests with time were almost identical, while with croaker and weakfish the curves of TB were less demonstrative of loss of freshness than those for VB.

BT values in fresh fish are in the range of 20 to 50 mg of TBN/100g. After 2 weeks in ice those values may reach 100 mg of TBN/100g.

I. INTRODUÇÃO

A determinação rápida e objetiva do estado de frescor de pescados, continua a ser um dos maiores problemas para o controle de qualidade da matéria-prima industrial.

O problema tem sido abordado por métodos microbiológicos, químicos e físicos. Estes últimos têm mostrado utilidade como critérios imediatos para a comercialização do pescado fresco, porém, para decisões de caráter tecnológico na indústria, ainda é necessário o auxílio de algumas determinações químicas não habituais.

Mesmo existindo um grande número de testes químicos disponíveis, apenas são empregados, corriqueiramente, a determinação de trimetilamina e das Bases Voláteis e, ocasionalmente, de hipoxantina. A explicação destas escolhas encontra-se na sua razoável correlação com o estado de frescor e, principalmente, na simplicidade metodológica.

A complexidade da perda do frescor, faz com que determinações muito específicas não apresentem boa correlação com a realidade sensorial. Os testes químicos que medem grupos de substâncias, produtos de várias atividades deteriorativas, representam melhor a condição geral do frescor. Nestes, encontra-se a determinação das Bases Voláteis (BV) que permite registrar uma ampla gama de metabólitos da atividade endógena (degradação autolítica) e exógena (degradação microbiana).

Há suficiente pesquisa para aceitar a idéia de que não apenas as bases voláteis, formadas pela amônia e os seus derivados alquil substituídos, metilamina, dimetilamina e trimetilamina, representam

os compostos básicos produzidos na deterioração do frescor. A literatura relata a formação de bases não voláteis como histamina, cadaverina, putrescina, butilamina, de bases púricas livres ou ligadas ao fosfato, de aminoácidos básicos, especialmente lisina e histidina, e de outros metabólitos intermediários de caráter básico que se acumulam no sarcoplasma e nos fluídos intercelulares após captura. Se for possível desenvolver um método capaz de avaliar o conjunto de substâncias básicas geradas e não apenas as voláteis, disporíamos de um novo teste de frescor abrangendo atividades múltiplas, cujas somas se refletem na perda do frescor e, posteriormente, na putrefação. O teste poderia ser chamado de Bases Totais (BT), em contraposição às Bases Voláteis (BV).

Considerando que tal teste não existe relatado na literatura, torna-se necessário desenvolver uma metodologia analítica adequada, como condição primeira, antes de sua aplicação, como critério de frescor em pescados armazenados. Um problema básico a ser resolvido é a avaliação das bases por titulação direta, já que não é possível empregar a destilação. Convém salientar que o novo teste não é semelhante à determinação de nitrogênio não protéico (NNP), senão que envolverá apenas a fração de substâncias de caráter básico, contidas no NNP.

Para atingir os objetivos, esta pesquisa pretende abordar os seguintes aspectos:

- Estudo da extração das BT com diversos solventes;
- Estudo da recuperação de bases adicionadas no pescado;
- Efeito dos solventes na eliminação de interferentes da titulação;
- Estudo dos álcalis específicos para liberação das bases em temperatura ambiente;

- Estudo da inter-relação entre NNP, BV, TMA e BT;
- Estudo da evolução das BT e das BV em diversos pescados armazenados em gelo; e
- Análise qualitativa preliminar dos compostos que formam as BT.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão da bibliografia que se detalha a seguir foi orientada às publicações que relatam a presença de compostos com caráter básico forte ou fraco, que eventualmente poderiam ser determinados como "bases totais" nas condições propostas na presente pesquisa. Naturalmente, por tratar-se de um teste novo, não há informações diretas para serem aproveitadas como critérios de julgamento da qualidade, porém podem servir como subsídio para interpretação das cifras, assim como para estabelecer comparações entre os valores dos testes convencionais e os valores das nossas pesquisas.

Visto que as nossas experiências empregam o extrato do material nitrogenado não protéico (NNP) do músculo de pescado, parece recomendável examinar, primeiramente, as diferentes substâncias que têm sido pesquisadas nestes extratos.

2.1. NITROGÊNIO NÃO PROTÉICO DOS PESCADOS (NNP)

A fração nitrogenada não protéica é feita por compostos de baixo peso molecular, que estão dissolvidos no sarcoplasma dos miofibrilos e nos fluídos intercelulares. São substâncias totalmente solúveis em água, porém para obtê-las livres de proteínas e polipeptídeos, também solúveis em água, é mais conveniente empregar soluções ácidas, álcoois, acetona ou então misturas destes extractantes (CONTRERAS, 1984 e KUAYE, 1982).

STANSBY *et alii* (1944) sugeriram o emprego de etanol entre 65 e 70% como agente de extração. MORGA (1975) descreve o método usado no Instituto de Fomento Pesqueiro, que emprega ácido tricloroacético 5% na relação de 1:3 (peixe : extratante). KUAYE (1982) sugere a extração com ácido sulfúrico 2,5% em mistura com sulfato de sódio 7,5% na relação de 1:3 (peixe : extratante). Por qualquer um dos procedimentos acima mencionados, a quantidade de NNP representa de 9,2 a 18,3% do nitrogênio total dos peixes teleosteos. Para a família clupeidae (sardinhas, arenques, manjubas), SIMIDU (1961) relata de 16 a 18% de NNP. Nos peixes gadídeos (merluza, bacalhau) o mesmo autor cita valores entre 9 e 14% de NNP, e para os peixes elasmobranqueos (cações e arraias) as porcentagens se elevam para 33 a 38%.

BORGSTROM (1962) salienta que o teor de NNP dos crustáceos e moluscos é maior que o dos peixes teleosteos chegando a ser 20% do N total.

NETO (1984) pesquisou o teor de NNP na tilápia híbrida (cruzamento entre nilótica e hornorum) encontrando valores de 294 mg de NNP/100 g, o que representa 9,87% do N total, valor próximo do citado por SIMIDU (1961) em peixes de carne branca de origem marinha. Os valores de NNP dos peixes de carne escura variam entre 290 e 440 mg/100 g (ENDO E SIMIDU, 1955; LUKTON & OLCOTT, 1958; ARARAQUI & SUYAMA, 1966; e HASHIMOTO *et alii*, 1979).

A percentagem de NNP varia com o tempo de estocagem em gelo. Há certa controvérsia sobre o destino dos compostos do NNP durante a estocagem e sobre a validade desta determinação como teste de frescor. NETO (1984) encontrou que o valor inicial de 294 mg de NNP/100 g apresentava uma diminuição contínua chegando a valores em

torno de 240 mg após 20 dias de manutenção das tilápias em gelo. A tendência ao declínio do NNP pode estar relacionada com a lixiviação devida ao degelo (SHEWAN, 1962; e COB III *et alii*, 1973), porém também pode ser resultado da utilização de alguns dos compostos do NNP por microrganismos, que os transformam em ácidos voláteis e aminas livres (LUDORFF & MEYER, 1973). SAKAGUCHI *et alii* (1982) demonstraram que os músculos brancos do yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) apresentaram 591 mg de NNP/100 g e que este valor se manteve quase constante durante 40 dias de estocagem a 0°C em condições estêreis. No primeiro dia determinaram-se 218 mg de NNP/100 g e o valor só aumentou para 264 após 33 dias de estocagem.

Outros autores (SIEBERT, 1962 e VARELA & WOJECIECH, 1956) relatam que o NNP apresenta um aumento contínuo através da estocagem, atribuída à proteólise das proteínas dos miofilamentos e do sarcoplasma causada pelas catepsinas numa primeira etapa e logo pelas proteases de origem microbiana. WOOD *et alii* (1942) e RASMUSSEN (1950) chegam a sugerir a determinação de NNP, através da determinação de tirosina, como índice de frescor em peixes refrigerados.

MORGA (1975) estudando a determinação de tirosina encontrou que 640 mg de tirosina por 100 g de músculo era um valor limite para aceitação de pescada foguete (*Macrodon ancylodon*). O peixe fresco tinha 520 mg/100 g de modo que a variação em vários dias não foi muito demonstrativa da perda de frescor.

O critério atual é de não recomendar a determinação global do NNP como índice de frescor. Entretanto, se a determinação do NNP global apresenta dúvidas para se acompanhar a deterioração, alguns grupos de compostos, nele contidos, têm sido reconhecidos como de grande valor para esta finalidade. Especialmente para nós, inte

ressam aqueles compostos que, após sofrer transformações bioquímicas ou microbiológicas possam gerar metabólitos de caráter básico.

2.1.1. Degradação de Nucleotídeos como Fonte de Amônia

A amônia é o constituinte mais comum dos músculos animais, resultando das desaminações normais do metabolismo celular. De acordo com IDEKA (1980), SPINELLI (1971) e BURT (1977), a evolução do ATP muscular, após a morte, leva à formação de amônia, bases purícas livres, inosina e hipoxantina, como pode ser apreciado no esquema da FIGURA 1. A quantidade de amônia produzida pela degradação dos nucleotídeos musculares depende da extensão com que o ATP foi desaminado antes da morte dos peixes.

Segundo STONE (1971) o esgotamento total do ATP ocorre entre 24 e 48 horas após a morte. LUDORFF & MEYER (1973) apontam que o término da fase de rigidez muscular (rigor mortis) coincide com o desaparecimento do ATP.

TARR (1966) encontrou que o teor de ATP com peixes absolutamente frescos, capturados sem luta, era de 5,0 a 8,0 μ moles/g. Porém, vários autores têm relatado quantidades menores que 5,0 μ moles: SHAW *et alii* (1977) detectaram apenas 1,85 μ moles de ATP/g em um tipo de linguado, o "witch flounder" (*Glyptocephalus cynoglossus*) e KASSEMSARN *et alii* (1963) encontraram apenas 0,2 μ moles/g em haddock, lemom sole, plaice e outros peixes planos (linguados). Estes peixes são capturados com redes de arraste, sistema que segundo JONES & MURRAY (1962) causa uma grande exaustão do ATP.

Estas considerações precisam ser levadas em conta quando se determina bases voláteis (BV) como teste de frescor, já que a

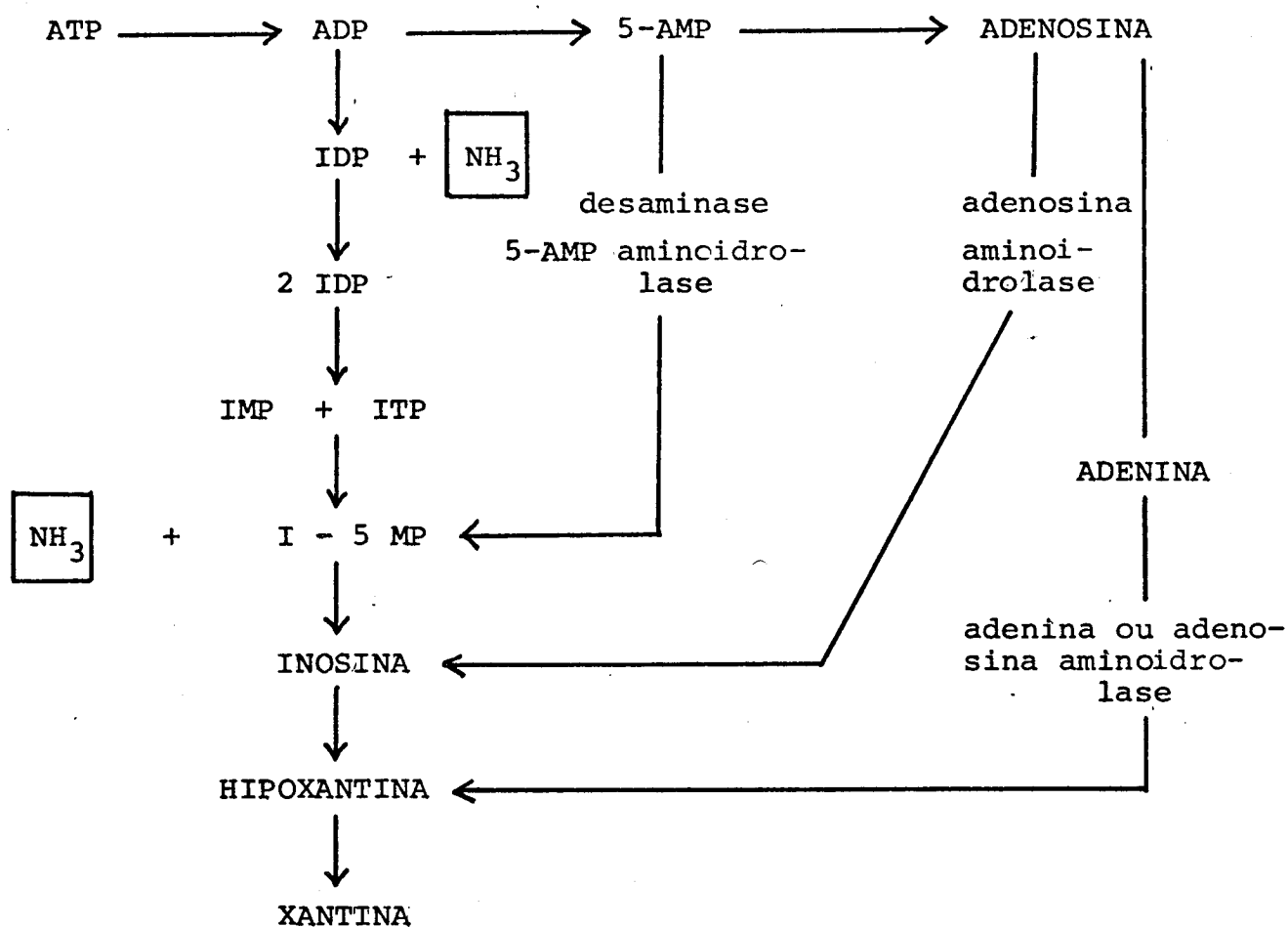


FIGURA 1 - Degradação do ATP no músculo de peixe após a morte (IDEKA, 1980; SPINELLI, 1971 e BURT, 1977).

amônia perfaz mais de 90% das BV (MOLTENO *et alii*, 1967). E segundo o método de pesca, podem acumular-se quantidades relativamente altas de amônia, mesmo em peixe de captura recente. Paralelamente, o ADP e AMP acumulados durante o esforço serão desaminados nos primeiros dias da estocagem, aumentando o teor de N-amônia cal abruptamente.

UCHIYAMA *et alii* (1970) relatam que a quantidade total dos produtos de degradação do AMP (inosina, inosina mono fosfato e hipoxantina) no músculo de yellowtail com alguns dias de estocagem a 0°C, encontrava-se entre 660 a 1.050 μ moles/100 g. Na base destes dados SAKAGUCHI *et alii* (1982) calcularam que após desaminação total dever-se-iam obter entre 9,2 e 14,7 mg de N amoniacal/100 g. Este valor coincide quase que exatamente com as BV por eles determinadas nos primeiros 4 dias de estocagem do yellowtail, concluindo-se que a maior parte da amônia, nos primeiros dias, provém da desaminação intrínseca e não de contaminação externa. As enzimas que participam da desaminação dos nucleotídeos e dos seus produtos secundários têm sido detectadas e caracterizadas na maioria dos pescados de interesse comercial.

TARR E COMER (1964) detectaram em bacalhau as duas enzimas de maior importância: a 5-AMP aminoidrolase e a adenosina aminohidrolase, as duas concorrendo para a produção de inosina. STONE (1970) trabalhou com extratos de três espécies de salmão encontrando, também, as duas enzimas acima mencionadas. Entretanto, no músculo de vieira (scallop) e de caranguejo, só foi detectada a adenina aminohidrolase. DINGLE *et alii* (1968) não detectaram, em lagosta, a 5-AMP aminohidrolase, no entanto, ARAI (1966) e CHIA-PING *et alii* (1978) encontraram as duas hidrolases em músculo de camarão.

SAINCLIVIER (1983) cita algumas pesquisas sobre a existência de enzimas localizadas na pele dos pescados que desaminam a guanina com liberação de grande quantidade de amônia e atuando ainda em temperaturas próximas a 0°C. Tais enzimas produzem, além do amônia, piridina e bases relacionadas.

DOKE *et alii* (1979) relatam que o bombay duck (*Harpodon nehereus*) con

têm a maior parte das enzimas hidrolíticas no líquido exsudado (drip); entretanto, na tilápia mossambica a maior concentração de enzimas hidrolíticas, incluindo as que liberam fosfato inorgânico, se encontram na pele.

2.1.2. Aminoácidos Livres e Peptídios Musculares e sua Contribuição na Formação de Amônia

Segundo SOUDAN (1965) o teor e tipo de aminoácidos livres nos músculos de peixe fresco é característico da espécie, apresentando algumas variações sazonais. O mesmo autor opina que mesmo existindo uma certa evolução no teor de aminoácidos livres com o estado de frescor, as variações não têm um comportamento suficientemente regular para serem adotadas como índices de frescor.

Entretanto, os metabólitos da degradação de aminoácidos, principalmente amônia e aminas, prestam-se para acompanhar mudanças de deteriorativas (KUAYE, 1982; e MORGA, 1975).

2.1.2.a. Aminoácidos não Protéicos e Peptídios

Junto com os aminoácidos comuns das proteínas, os pescados apresentam quantidades elevadas de taurina, β -alanina e 1-metil histidina (SAINCLIVIER, 1983). A taurina existe livre, entretanto os outros dois aminoácidos fazem parte de um dipeptídios típico muscular: anserina. A β -alanina com a histidina forma o dipeptídio carnosina (KRZECZKOWSKY, 1974). O mesmo autor menciona outro aminoácido não protéico gerado a partir do desdobramento da creatina: a sarcosina.

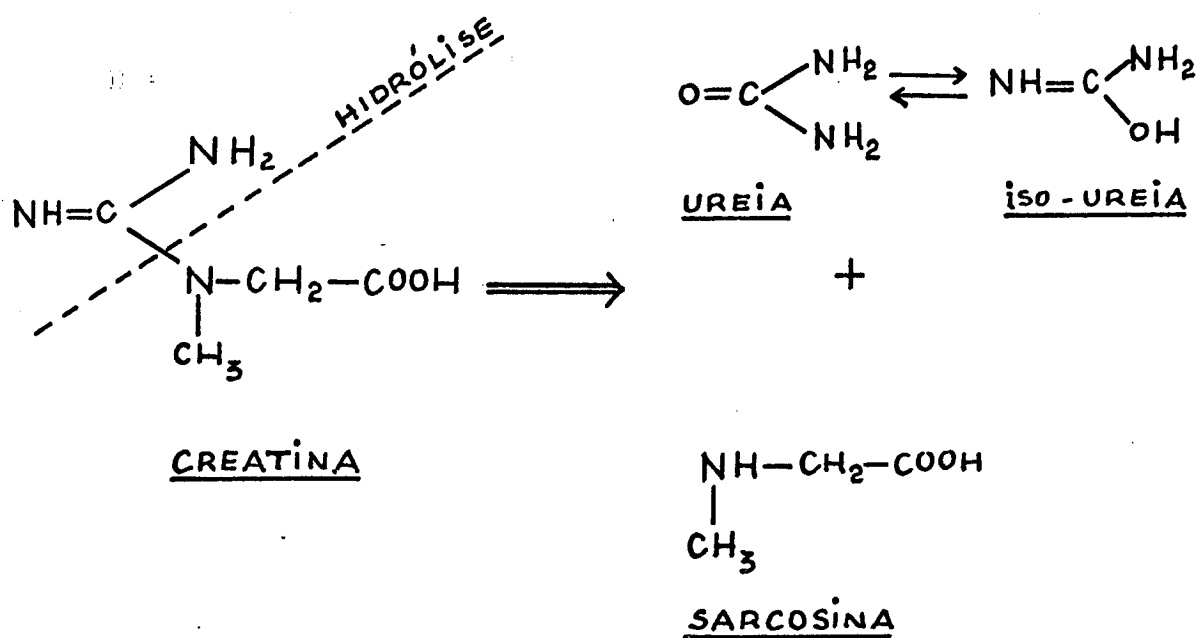


FIGURA 2 - Hidrólise da creatina.

A creatina é uma base diaminada, portanto um componente com caráter básico que existe em taxas elevadas, especialmente nas espécies de movimentação rápida (arenque, salmão, carpa). Ela tem uma importante função biológica formando a fosfocreatina. IKEDA (1980) relata que a creatina encontra-se em quantidades entre 160 a 720 mg/100 g, sendo mais concentrada nos músculos brancos que nos escuros. SAKAGUCHI *et alii* (1982) encontrou 528 mg/100 g na zona muscular mais clara de yellowtail e 166 mg/100 g nos músculos escuros. Os autores calcularam que a creatina contribui com 21 - 29% do NNP. JACQUOT (1961) menciona o fato de que nos crustáceos não tem sido detectada creatina.

2.1.2.b. Aminoácidos Livres de Origem Protéica

Segundo SHEWAN & JONES (1957), o músculo fresco de bacalhau contém entre 70 e 75 mg/100 g de aminoácidos livres. Este valor representa menos de 10% do NNP do músculo deste peixe. Em contraste, no yellowtail (um peixe de carne escura) os aminoácidos livres perfazem em torno de 60% de NNP (SAKAGUCHI, 1982). A histidina, segundo o mesmo autor, é de longe o aminoácido livre mais importante neste peixe (1,160 mg/100 g) contribuindo sozinha com 53% do NNP.

Com poucas exceções, os peixes de carne branca têm quantidades pequenas de histidina contribuindo apenas com 0,1 a 7,0% do NNP (SIMIDU, 1961; KIMATA, 1961). A histidina concentra-se em alguns peixes na banda lateral escura que pode conter entre 200 e 400 mg de histidina por 100 g de carne (LUKTON & OLCOTT, 1958; ITO, 1957; HIKIBI & SIMIDU, 1959).

Um teor alto de histidina favorece a formação de histamina que em taxas elevadas pode causar intoxicações.

A histidina, tanto pela quantidade, em que se apresenta, quanto por ser um aminoácido básico, tem enorme interesse no desenvolvimento da presente pesquisa sobre um novo teste de frescor de pescados baseado na determinação das substâncias básicas totais.

Os outros aminoácidos contribuem no NNP com quantidades pequenas. JACQUOT (1961) menciona que a lisina livre existe em quantidades em torno de 10 mg em peixes frescos. SAKAGUCHI (1982) encontrou 22 mg/100 g músculo claro e 5 mg/100 g no músculo escuro de yellowtail. JONES, citado por SHEWAN & JONES (1957) relata que o teor de lisina livre do bacalhau é sazonal variando de 13 mg no inverno para 0 mg na primavera. A maior parte dos aminoácidos livres ocorre entre 0 mg e 30 mg/100 g.

Após a histidina e lisina seguem-se em importância a glicina e alanina. Os aminoácidos menos concentrados são a arginina, ácidos glutâmico e aspártico e cistina (SAINCLIVIER, 1983).

2.1.2.c. Degradação Geral dos Aminoácidos

A amônia derivado dos aminoácidos é produzido abundantemente nas últimas fases da deterioração dos pescados (LISTON, 1980). A amônia produzida inicialmente pela degradação de nucleotídeos eventualmente poderia ser reempregada em certas sínteses, mantendo-se num nível estável, ou ainda diminuindo (NETO, 1984). Porém, assim que a atividade bacteriana aumenta o teor de amônia se eleva abruptamente (SOUDAN, 1965; e LISTON, 1980).

As reações envolvidas na produção de amônia têm sido resumidas por BRAMSTEDT (1961), no seguinte esquema:

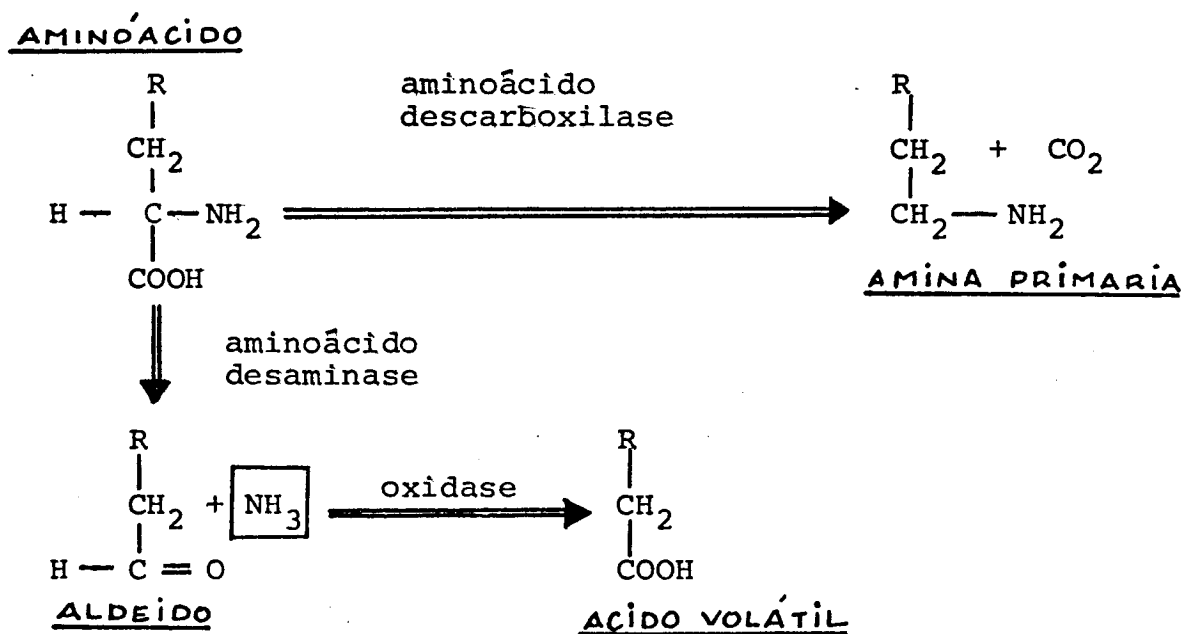


FIGURA 3 - Formação de amônia e aminas a partir de aminoácidos.

O mecanismo que leva à produção de amônia predomina quando o pH se torna alcalino, desfavorecendo a atividade descarboxilásica. Por qualquer um dos caminhos da degradação, são geradas substâncias de maior basicidade que o aminoácido original. LAZLO (1975) cita numerosos exemplos de reações com aminoácidos específicos: a L-alanina resulta em amônia e piruvato, a L-cisteína produz amônia, piruvato e ácido sulfídrico, o triptofano gera amônia, piruvato e indol. Ou tras reações foram compiladas por KUAYE (1982).

À medida que a desaminação progride, os aminoácidos vão sendo repostos com maior ou menor velocidade pela hidrólise das proteí - nas miofibrilares. SHEWAN & JONES (1957) demonstraram que quase todos os aminoácidos livres sofrem diminuição com o tempo de esto - cagem em gelo, com a notável exceção da lisina, que aumenta conti - nuamente nos primeiros 10 a 12 dias. Os autores acreditam que as proteases bacterianas hidrolisam a lisina terminal de um modo pre - ferencial. Na opinião de CASTRO (1973) e COBB *et alii* (1973), a diminuição dos aminoácidos pode ter origem na lavagem de solú - veis, que inevitavelmente ocorre em pescados armazenados com gelo. Esta hipótese tem base experimental pois, quando o músculo de pescado ~~foi~~ inoculado com pseudomonas e mantido refrigerado sem gelo, obser - vou-se um acúmulo de leucina, valina, ácido aspártico e lisina (SHEWAN & JONES, 1957).

Um fato interessante é a constatação de que os aminoácidos li - vres mudam pouco ou nada em pescados conservados a 0°C sobre condi - ções estéreis. SAKAGUCHI (1982) constatou que apenas a glicina e a lisina aumentaram no músculo de yellowtail durante 40 dias a 0°C, concluindo que o papel das proteases musculares (autólise) na gera - ção de aminoácidos livres é irrelevante. A mesma conclusão foi

obtida para as desaminases de origem muscular. Por estas razões, deve-se enfatizar que o problema primordial dos pescados, como alimentos, está ligado a sua qualidade microbiológica (SHEWAN, 1971).

2.1.2.d. Formação de Aminas e Compostos relacionados

O aparecimento de substâncias básicas diferente da amônia pode ocorrer pela degradação dos aminoácidos, dos nucleotídeos ou de outras substâncias típicas do músculo.

As aminas simples, timetilamina (TMA) e dimetilamina (DMA), provêm da mesma fonte: o óxido de trimetilamina (TMA-O), um composto que contribui com 1 a 7% do NNP (MURATA *et alii*, 1980). SOUDAN [1983] relata que o atum contém apenas entre 0,1 e 2 mg de TMA-O/100 g, entretanto em peixes cartilaginosos (cações, arraias), o TMA-O pode atingir 1500 mg/100 g. Segundo IKEDA (1980), o TMA-O provavelmente se forma da colina e das betainas, que são bases de amônia quaternária abundantes nos fluídos celulares dos pescados. O mesmo autor menciona que o TMA-O, com raras exceções, não se encontra a nível de fitoplancto. SIMIDU (1961) postula um papel de regulador da pressão osmótica, semelhante ao papel que teria a uréia nos peixes cartilaginosos já que tanto o TMA-O como a uréia existem em taxas muito mais elevadas nos peixes elasmobrânqueos do que nos teleósteos.

A formação de TMA ocorre por ação dos microrganismos redutase⁺ e por enzimas dos próprios tecidos. A primeira via é muito mais importante. A DMA se forma só em algumas famílias de peixes (gadideos). A FIGURA 4 mostra as equações de formação da TMA e DMA, coletadas por CONTRERAS (1984).

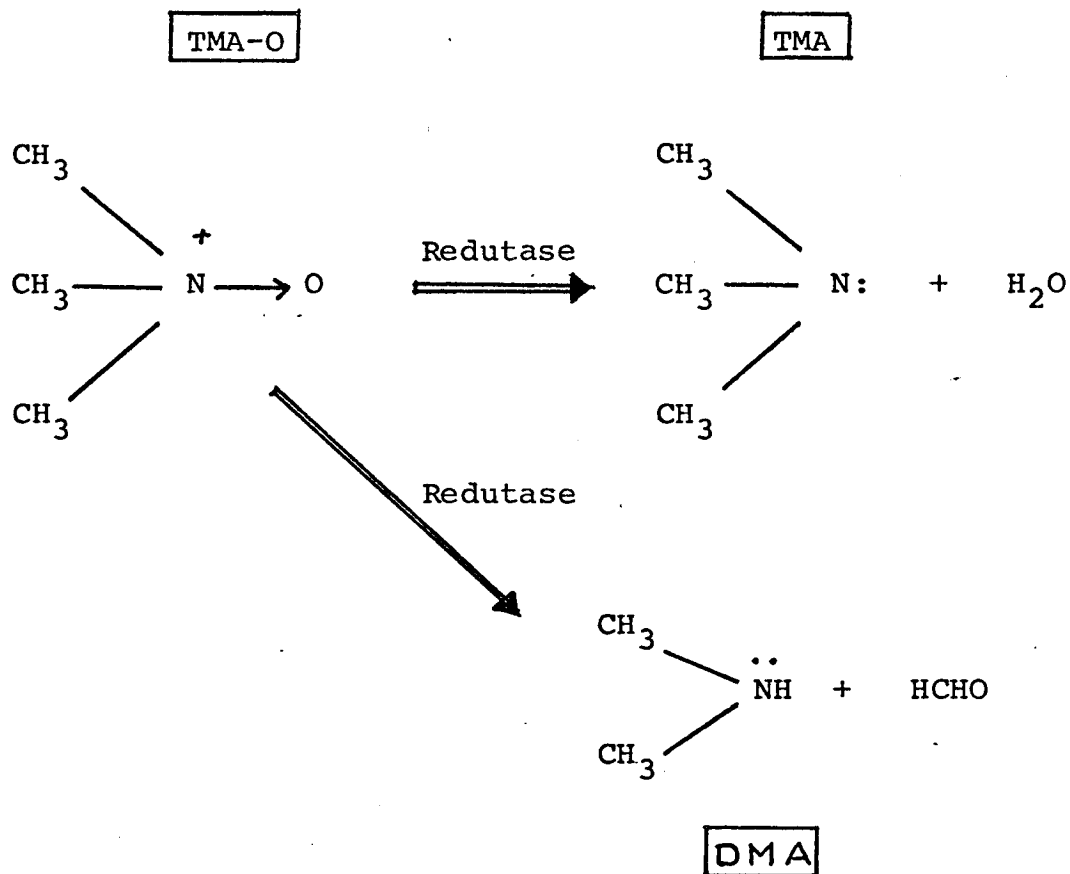


FIGURA 4 - Formação de TMA e DMA em pescados.

As aminas de cadeia longa se formam por atividade enzimática bacteriana sobre aminoácidos, especialmente os aminoácidos básicos. RITCHIE (1980) esquematizou, de forma geral, a produção de aminas de cadeia longa, de acordo com a FIGURA 5.

Outro esquema foi proposto por BRAMSTEDT (1961), no qual a lisina era descarboxilada para cadaverina e, após várias etapas, terminava em piperidina, uma base cíclica.

A amina mais importante da FIGURA 5 é a histamina que se forma por descarboxilação da histidina, notadamente nos peixes de carne escura (SOUDAN, 1965). A descarboxilase da histidina é de origem bacteriana, envolvendo *Proteus morganii*, que produz histamina

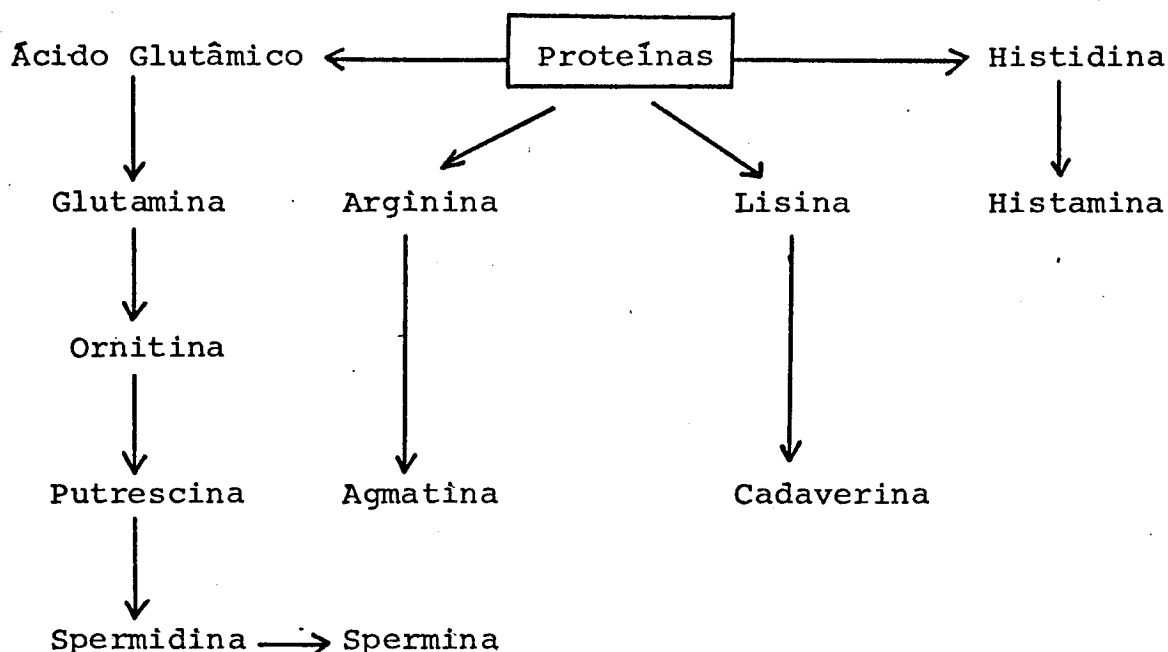


FIGURA 5 - Formação de aminas superiores por degradação de aminoácidos.

e saurina (NERISSON, 1976]. Outros microrganismos, com atividade descarboxilásica, são *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*. Todos formam histamina usando o dipeptídeo contendo histidina (carnosina).

A histamina é produzida, principalmente, em peixes da família Scombridae (bonito, serra, atum e cavalinha), quando são deixados sem refrigeração (20 a 30°C] por algumas horas. Nestas condições, os músculos podem atingir valores acima de 100 mg/100 g. KIMATA (1961) relata que peixes mantidos a 17°C, durante três dias, atingiram 354 mg/100 g. A 35°C, pelo contrário, foi produzida uma pequena quantidade de histamina predominando a formação de amônia.

A contribuição das amins de cadeia longa teria uma importância relativa na basicidade total, pois elas aparecem nos últimos estágios de decomposição, quando os peixes são rejeitados pelos critérios da avaliação sensorial.

SAINCLIVIER (1983) afirma que a formação de bases heterocíclicas pode ocorrer na degradação de nucleotídeos, notadamente na passagem de adenosina para adenina e hipoxantina, como mostra a FIGURA 6. A partir da guanosina podem-se gerar, também, as bases respectivas guanina e xantina.

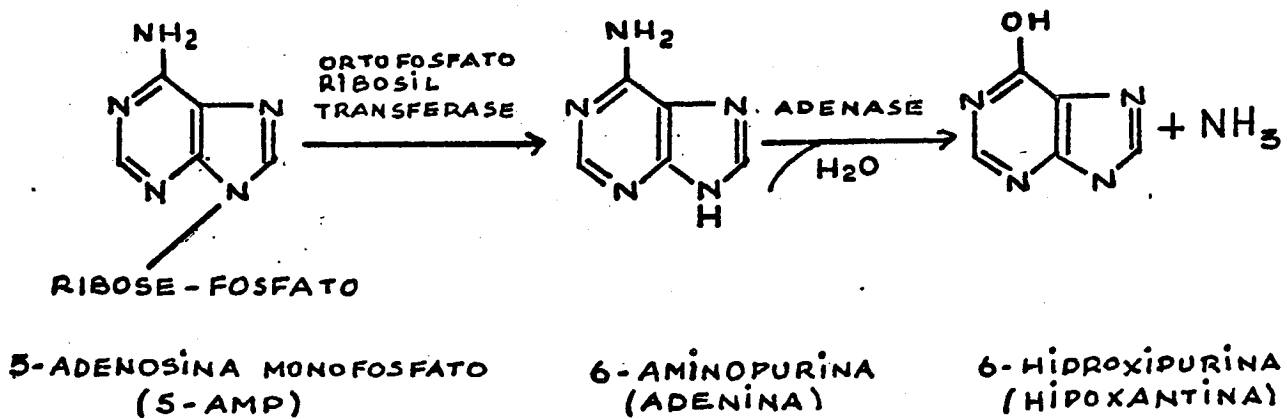


FIGURA 6 - Formação de bases heterocíclicas em músculos de peixes durante a estocagem refrigerada.

2.2. MÉTODOS QUÍMICOS E FÍSICOS EM CONEXÃO COM A DETERMINAÇÃO DAS BASES TOTAIS (BT)

Além da determinação de NNP pelo método de Kjeldahl, já comentado, outras três determinações para avaliação de frescor tem alguma relação de proximidade com o método proposto na presente pesquisa (BT).

2.2.1. Determinação das Bases Nitrogenadas Voláteis (BNV)

O método BNV, ou simplesmente BV (Bases Voláteis), permite de terminar o teor de Nitrogênio Volátil que pode ser destilado seja do músculo de pescado diretamente (LUCKE & GEIDEL, descrito por PEARSON (1976); MENDES, 1974; CIDA/FAO, 1977), ou de extratos de músculo obtidos com etanol (STANSLY *et alii*, 1944); com ácido tricloroacético (CONTRERAS, 1984; MORGA, 1975) e com ácido sulfúrico (KUAYE, 1982).

As substâncias voláteis contendo nitrogênio são deslocadas por aquecimento e alcalinização suave em valores de pH entre 9 e 10 usando óxido de magnésio, hidróxido de sódio ou borato de sódio (KUAYE, 1982).

REPOSSI (1968), MOLTENO *et alii* (1966) analisaram os líquidos da concentração da água de cola, na fabricação de farinha de pescado concluindo que o material nitrogenado volátil continha: amônia, metil, dimetil e trimetilamina, além de outras duas aminas não identificadas provavelmente butilamina e propilamina. O N volátil comumente é titulado com HCl é expresso em mg de BNV/100 g de amostra. O limite máximo de BNV (ou BV) para caracterizar os pescados como aceitáveis ou inaceitáveis para consumo humano situa-se em 30 mg. Este valor encontra-se aprovado oficialmente no Japão (TOMIYAMA *et alii*, 1956); na Argentina (LUPIN & TRUCCO, 1978), Austrália (COBB & VANDERZANT, 1975), na Alemanha (ANTONACOPOULOS, 1973) e no Brasil (Instituto Adolfo Lutz, 1976, Dipoa, 1974).

A determinação de Bases Voláteis é o método para avaliação do frescor mais utilizado no mundo e, por esta razão, foi incluído como teste de acompanhamento do novo método (BT).

2.2.2. Determinação da Capacidade Tampão de Músculo Pescado durante a Deterioração

Entre 1930 e 1953, foi desenvolvida uma intensa pesquisa sobre a potencialidade da determinação da capacidade tampão do músculo como índice de frescor.

CUTTING (1953) cita e comenta os resultados das pesquisas anteriores (STANSLY & LEMON, GRIFFITHS & STANSLY, BEAUTTY & GIBBONS, HJORTH-HAUSEN e outros) a fim de esclarecer os aspectos contraditórios relatados até então. O método aperfeiçoado e padronizado por CUTTING, para avaliar as variações da capacidade tampão de carne durante o envelhecimento, se baseia na medição do volume de HCl N/60 gasto para levar o pH de 5 g de carne de peixe, desde um valor pré-fixado em 6,0 para 5,3, 4,65 e 4,3. A capacidade tampão na zona alcalina foi avaliada por titulação com NaOH N/60, registrando os volumes gastos para atingir 7,0, 8,0, 9,0, 9,5 e 10,0. O autor conclui que os volumes de ácido ou soda para um mesmo peixe variavam muito, não tinham uma relação nítida com os dias de estocagem e o tempo para atingir estabilidade do pH era prolongado demais para testes rotineiros. Após esta pesquisa, o teste foi definitivamente abandonado.

Entretanto, é interessante para nossa pesquisa conhecer a série de compostos tamponantes relacionados por CUTTING (1953). O autor comenta que entre o 8º e 10º dias ocorreu uma diminuição da capacidade tampão da zona entre pH 4,3 - 4,65 e entre 4,65 - 5,3. Tal decréscimo coincide, de perto, com o desaparecimento do TMA-O ($pK'_b = 9,4$) e aparecimento concomitante de trimetilamina ($pK'_b = 4,1$) e especialmente com o abrupto aumento de amônia ($pK'_b = 4,7$).

Outras substâncias de interesse na capacidade tampão são certamente as proteínas solúveis, os peptídios, aminoácidos e outros compostos solúveis mencionados por REAY *et alii* (1946).

2.2.3. Evolução do pH durante a Deterioração

O pH dos peixes recém-colhidos é da ordem de 7,0, dependendo, grandemente, do esforço feito na captura (AMLACHER, 1961). A carne escura dos peixes tem um pH inicial em torno de 6,25, contra um valor de 6,85 para os músculos brancos (SOUDAN, 1965).

A evolução do pH como índice de frescor baseia-se na formação de ácido lático durante o *rigor mortis*, que diminui o pH e logo um aumento gradual, pela capacidade tampão do músculo e pela formação de substâncias básicas por mecanismos enzimáticos e microbiológicos (LISTON *et alii*, 1963).

A correlação entre pH e dias de estocagem é variável. NETO (1984) demonstrou que em tilápia híbrida não houve correlação significativa em dois experimentos e altamente significativa em um experimento.

BOTTA *et alii* (1978) relata que o capelin (*Mallotus villosus*) armazenado em gelo tinha um pH inicial de 7,2, não apresentou nenhuma queda própria da degradação do ATP e não mudou, quase nada, durante 16 dias, data em que atingiu um pH de 7,28.

LAHIRY *et alii* (1963) encontrou que o pH inicial de várias espécies de água doce era de 6,4 a 6,9. Na estocagem em gelo não apresentaram grandes modificações atingindo valores de 7,0, após 8 a 12 dias em gelo.

· Aparentemente, os mesmos fatores que inviabilizam a aplicação da "capacidade tampão", como critério da avaliação frescor, também afetam a sensibilidade da medição do pH, para refletir mudanças de teriorativas. É necessário pesquisar métodos para eliminar as substâncias de capacidade tampão elevada, que mascaram as mudanças do pH e que também impedem a determinação das substâncias básicas totais por titulação simples e direta.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Peixes

- Tilápia híbrida (cruzamento homorum macho com nilótica fêmea);
- Cavalinha (*Scomber scombrus*);
- Sardinha (*Sardinella aurita*);
- Corvina (*Micropogon furnieri*);
- Pescada (*Macrodon ancylodon*); e
- Corimbatã (*Prochilodus reticulatus*).

O único peixe coletado absolutamente fresco foi a tilápia híbrida, que foi obtida na Estação Experimental de Pirassununga, SP. Os outros foram adquiridos num frigorífico local na cidade de Campinas, SP., sob encomenda e no melhor estado de frescor possível, dentro das condições normais de comercialização.

3.1.2. Reagentes

- Ca(OH)_2 , MgO, ZnO e CaCO_3 , todos anidro (Merck);
- Tolueno, heptano, etanol e metanol p.a. (Grupo Química);
- Púrpura de bromocresol (Merck) 0,1% em etanol absoluto;
- Hidroclorato de trimetilamina e cloreto de amônia (Mallinckrodt);
- Tampões de citrato de sódio 0,4 N pH 3,95; 0,2 N pH 3,25 e 1 N pH 6,4 (Beckman); e
- Reagente ninidrina (Beckman).

3.1.3. Aparelhos

- Liquidificador Arno, provido de um copo especial de 250 mL, que dispensa o uso de tampa;
- Micro-bureta automática para 5 mL totais, graduada em 0,01 mL;
- Evaporador rotativo (Fisatom);
- Agitador magnético (Fisatom);
- Destilador para Bases Voláteis;
- Digestor e destilador de nitrogênio de nível semi-micro;
- Analisador de aminoácidos Beckman, Modelo 119 CL;
- Potenciômetro B-221 (Micronal);
- Balança analítica (Ainsworth); e
- Balança semi-analítica (Procyon).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo das Amostras para Análise

No caso de tilápia, sardinha e cavalinha, foram separados filês de seis peixes, no mínimo, tendo-se o cuidado de não incluir zonas da barriga. Os filês com peles foram picados em aproximadamente 0,5 de lado, misturados e colocados em um becker imerso em gelo, até o momento da análise. Os peixes de maior tamanho foram filetados em número mínimo de dois indivíduos. No caso de peixes com escamas, foram descamados antes de obter-se os filês. A pele foi mantida em todos os casos.

3.2.2. Extrações

Foram pesadas 25 g de amostra picada no próprio copo do liquidificador, adicionando-se, em seguida, os solventes até completar 100 g, isto é, obedecendo uma relação 1:3 peixe:solvente. As misturas foram homogeneizadas por 90 segundos com velocidade máxima e logo deixadas em repouso por 5 minutos. Em seguida, foram filtradas em papel de filtro qualitativo (Klavin), desprezando-se os primeiros 10 mL. O líquido passa claro, porém, ocasionalmente foi necessário uma refiltração. Foram coletados, aproximadamente, 50 mL. O QUADRO 1 mostra os tipos de extratos que foram preparados.

QUADRO 1 - Extratos usados para pesquisa sobre determinação de Bases Totais.

Identificação	Peixe (g) + Solvente (g)	
Extrato I	25	+ 75 etanol absoluto
Extrato II	25	+ 75 etanol 75%
Extrato III	25	+ 75 etanol 66%
Extrato IV	25	+ 75 etanol 66% contendo 2% de CaCl_2
Extrato V	25	+ 75 metanol absoluto
Extrato VI	25	+ 75 ácido tricloroacético 5%
Extrato VII	25	+ 75 etanol absoluto + 2 g de Ca(OH)_2 sólido

3.2.3. Análises Químicas

3.2.3.a. Nitrogênio Não-Protéico (NNP)

Determinou-se o teor de nitrogênio por digestão ácida de 2 mL de cada filtrado, de acordo com o método AOAC nº18026 de 1980. Nos extratos etanólicos, o álcool foi evaporado antes da digestão, com prévia adição de uma gota de ácido sulfúrico para evitar perdas de nitrogênio volátil.

3.2.3.b. Trimetilamina (TMA)

Foi determinado pelo método de DYER (1945), com modificações MURRAY & GIBSON (1972). Devido ao fato do método ter sido alterado em alguns aspectos de importância, é detalhada a sequência completa conforme segue:

Em 2 mL dos extratos etanólicos, foi adicionada uma gota de ATC 5% e evaporados a vácuo. O resíduo foi recuperado em 2 mL de ATC 5%, sendo adicionado, a seguir, 2 mL de formaldeído 20%, 10 mL de heptano (ao invés de tolueno) e 3 mL de KOH 50%, agitação enérgica por um minuto, centrifugação e separação de 5 mL para reação com ácido pícrico 0,02 N que foi mantido em tolueno. A mudança de tolueno por heptano é muito favorável pois evita a secagem do tolueno com Na_2SO_4 anidro, o que foi demonstrado nesta pesquisa, causar pequenas perdas da TMA.

No extrato em TCA não foi necessário a evaporação preliminar, medindo-se diretamente 2 mL do extrato VI e continuando igual como com os extratos etanólicos.

3.2.3.c. Bases Voláteis (BV)

Foram avaliadas nas condições detalhadas por KUAYE (1982), baseadas no método do Instituto de Fomento Pesquero do Chile (IFOP).

3.2.3.d. Bases Totais (BT)

O método assim denominado nesta pesquisa, teve diversas sequências analíticas que formam parte do objetivo deste trabalho. Por este motivo, a determinação das BT é detalhada mais especificamente, como segue:

- Determinação das BT nos Extratos I e IV

Em 20 mL dos extratos foram adicionados, separadamente, 1 g de MgO , Ca(OH)_2 , ZnO e CaCO_3 sólidos, e a mistura foi mexida num agitador rotativo por dez minutos e logo filtrada em papel qualitativo, até coleta aproximada de 15 mL. Uma alíquota de 10 mL foi diluída com água destilada até 50 mL, adicionada de 0,2 mL de indicador púrpura de bromocresol 0,1% e titulada com HCl 0,02 N. A cor do indicador varia desde roxo azulado (básico) para verde (neutro) e amarelo (ácido). O ponto final escolhido foi o verde amarelado (verde limão), que corresponde a um pH entre 5,6 e 5,8.

Os brancos foram preparados diluindo o solvente usado na extração, com uma quantidade de água o mais próxima daquela que seria fornecida pelo peixe (item 3.2.4.). A 20 mL desta mistura foram adicionados, separadamente, 1 g de MgO , Ca(OH)_2 , ZnO ou CaCO_3 e processados da mesma forma que as amostras. O gasto de HCl 0,02N por cada 10 mL do branco, foi descontado do gasto das amostras.

Em alguns experimentos, o extrato IV (etanol 66% contendo 2% de CaCl_2), foi reajustado com etanol absoluto para dar o mesmo teor

de água do extrato I (item 3.2.6.).

- Determinação de BT no Extrato VI

Este extrato se encontra em meio aquoso, por isso precisa ser adicionado de etanol a fim de igualá-lo com o extrato I. A alcalinização e titulação foram semelhantes aos extratos I e IV.

- Determinação de BT no Extrato VII (Método Rápido)

Corresponde a uma modificação do extrato I e consiste na adição direta de 2 g de Ca(OH)_2 no copo contendo 25 g de peixe e 75 g de etanol absoluto, homogeneização da mistura por 90 segundos. A extração e alcalinização ocorre em uma só operação, de modo que após filtração o líquido pode ser titulado sem outros tratamentos. A titulação foi realizada de modo semelhante aos extratos I e IV. Os brancos consistiram na mistura de 2 g de Ca(OH)_2 com 75 g de etanol e água, na mesma proporção que ocorre nas amostras, batendo no liquidificador por 30 segundos e terminando o procedimento igual como nas amostras.

Em qualquer uma das extrações o valor das BT foi obtido pela fórmula:

$$\text{BT (mg N/100 g)} = \frac{(\text{mL HCl amostra} - \text{mL HCl branco}) \times \text{N HCl} \times 14 \times 100}{\text{Peso peixe na alíquota titulada}}$$

3.2.4. Estimativa do Volume Total da Fração Líquida e da Concentração de Peixe por mL

As análises de BV, BT, NNP e TMA foram realizadas em alíquotas da fase líquida resultante da mistura de 75 g do solvente com

a água de 25 g de pescado. A quantidade de água fornecida por 25 g de pescado, depende do tipo de pescado. Após várias determinações preliminares, foi considerada uma média de 80% de água para peixes magros (pescada, merluza e outros), logo 25 g fornecerão 20 g de água e o peso da fração líquida será então 95 g (75 g do solvente + 20 g da água do pescado). Para peixes gordos e semi-gordos, foi considerada uma média de 75% de água, logo 25 g fornecerão 18,75 g de água, que somadas ao solvente darão 93,75 g (75 + 18,75). Este método elimina a necessidade de filtrar, quantitativamente, as amostras, para o qual é necessário lavar os copos e a hélice do liquidificador, além do resíduo no filtro, o que pode introduzir erros maiores. Entretanto, se o peso da fração líquida total pode ser obtido facilmente, é necessário conhecer, também, o seu volume total, pois as determinações químicas foram feitas nesta base. Para tanto, foram pesados 50 mL dos filtrados da extração I de sardinha e pescada e os pesos obtidos foram convertidos para 93,75 g e 95 g, dando 111,47 mL e 112,65 mL, respectivamente. Considerando-se que os solutos das 25 g de pescado devem encontrar-se dissolvidos nos volumes acima mencionados, então, cada mL corresponderá a 0,224 g e 0,222 g de pescado, respectivamente. Com estes valores foram calculados os teores de BV, BT, NNP e TMA por 100 g de pescado.

Para os outros extratos do QUADRO 1, foram feitas as mesmas análises e cálculos, dando para sardinha (peixe típico gordo) e pescada (peixe típico magro) os valores do QUADRO 2.

QUADRO 2 - Valores da fração líquida em peso e volume e concentração de peixe (g/mL), para os diversos solventes usados na extração de músculos de pescado.

Identificação do Extrato	Peso Fração Líquida (g)		Volume Fração Líquida (mL)		g peixe/mL	
	p.gordo	p.magro	p.gordo	p.magro	p.gordo	p.magro
Extrato I	93,75	95,00	111,47	112,65	0,224	0,222
Extrato II	93,75	95,00	105,69	106,74	0,237	0,234
Extrato III	93,75	95,00	103,84	104,85	0,241	0,238
Extrato IV	93,75	95,00	102,97	104,24	0,243	0,240
Extrato V	93,75	95,00	111,45	112,84	0,224	0,221
Extrato VI	93,75	95,00	92,13	93,38	0,271	0,268
Extrato VII	93,75	95,00	111,00	111,76	0,225	0,224

3.2.5. Ensaio de Recuperação de Amônia adicionada como NH_4Cl , para avaliar a Eficiência do ZnO , MgO e Ca(OH)_2 na liberação do Nitrogênio Básico

Em 25 g de carne de sardinha (pesados em duplicata), foram adicionados 0,5 mL de uma solução de NH_4Cl , 1,25 N e completados até 100 g com etanol absoluto. Os lotes foram homogeneizados e filtrados de acordo com o item 3.2.2.. Do líquido, foram separadas três alíquotas de 20 mL e adicionadas de 1 g de ZnO , de MgO e de Ca(OH)_2 , respectivamente. Após agitação e filtração, foram titulados 10 mL para estimação da basicidade (M_2) correspondente à soma de N-amoniacal mais N-básico do peixe. Outra amostra foi processada de forma semelhante, porém, sem adição de NH_4Cl , para estimar somente a basicidade do peixe (M_1). Uma outra preparação consistiu na mistura de 0,5 mL de NH_4Cl , 1,25 N, com 18,75 g de água e 74,5 g de etanol absoluto. Após agitação da mistura com ZnO , MgO e Ca(OH)_2 , foi determinada a basicidade do N-amoniacal liberado do NH_4Cl (A_1).

Os brancos (B) não contêm NH_4Cl , nem peixe e foram preparados misturando 18,75 g de água e 75 g de etanol absoluto. O líquido foi logo agitado com ZnO , MgO e Ca(OH)_2 a fim de estimar a contribuição destes álcalis na basicidade total.

Finalmente, 10 mL da solução A_1 foram destilados com NaOH , num destilador de nitrogênio, para conhecer a quantidade absoluta de N (A_2).

A basicidade das amostras e dos brancos foi expressa como volume de HCl 0,02 N gasto na titulação de 10 mL do filtrado.

A percentagem de recuperação do N do NH_4Cl foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de N recuperado} = \frac{A_1 - B}{A_2} \times 100$$

E a recuperação nos sistemas com pescado foi obtida pela fórmula:

$$\% \text{ de N recuperado} = \frac{M_2 - M_1}{A_2} \times 100$$

3.2.6. Influência da Percentagem de Água do Etanol no Valor das BT

Foram preparadas cinco extrações de sardinha com etanol absoluto (Extrato I) e cinco com etanol 66% contendo 2% de CaCl_2 (Extrato IV). Os cinco filtrados de cada preparação foram misturados (volume total em torno de 380 mL) e divididos em alíquotas de 20 mL em tubos com tampa de rosca. Os tubos com Extrato I receberam 0; 0,5; 1,6; 2,9; 4,3; 5,8; 7,6 e 9,7 mL de água destilada, obtendo-se, assim, percentuais de água próximos de 20, 22, 26, 30, 34, 38, 42 e 46%, respectivamente. Nos tubos com Extrato IV foi adicionado suficiente álcool absoluto para reduzir o teor de água desde o valor inicial de 44,25 até 20%. A seguir, foi adicionado 1 g de Ca(OH)_2 por tubo e, após agitação e filtração (item 3.2.2.), 10 mL foram titulados com HCl 0,02 N. O volume gasto foi reexpresso em amostra sem diluição, multiplicando por 1,025; 1,08; 1,145; 1,215; 1,29; 1,38 e 1,485, respectivamente. Estes fatores foram obtidos da relação: amostra diluída com etanol : amostra original.

3.2.7. Influência da Quantidade de MgO ou Ca(OH)₂ no Valor das BT

Foi determinada nos extratos I e VI (TCA), por adição de quantidades crescentes de MgO ou Ca(OH)₂, desde 0,2 até 2,0 g em 20 mL dos extratos. Os tubos foram agitados por 10 minutos, filtrados e titulados.

3.2.8. Influência do Tempo de Agitação do Alcalinizante no Valor das BT

Em alíquotas de 20 mL dos extratos I e VI, foi adicionado 1 g de MgO ou Ca(OH)₂ e agitado desde 2,5 até 60 minutos. Nos primeiros 10 minutos as titulações foram feitas a cada 2,5 minutos, logo aumentadas para períodos de 5 minutos até completar 30 minutos. Uma última medição foi feita após 60 minutos.

3.2.9. Estudo de Composição dos Extratos por Cromatografia de Troca Iônica e Reação com Ninidrina

Foram examinados quatro extratos dos peixes mais representativos desta pesquisa: pescada, corvina, sardinha e corimbata.

O preparo da amostra para injeção no autoanalisador de aminoácidos foi a seguinte: mediu-se um volume dos filtrados contendo 10 mg de NNP. Neles foi adicionada uma gota de HCl 0,1 N, para fixar as aminas, e o líquido foi evaporado a vácuo. O resíduo foi recuperado em 1 mL de tampão citrato de sódio 0,4 N e aplicado 0,1 mL (1 mg de NNP) para fracionamento.

A cromatografia dos aminoácidos e outras substâncias positivas à ninidrina foi realizada num aparelho Beckman modelo 119 CL com coluna catiônica W3H Beckman de 220 x 6 mm. A operação foi

feita com temperatura programada desde 50°C a 65°C, em 90 minutos. A eluição foi realizada com os seguintes tampões:

- a) Citrato de sódio 0,2 N pH 3,5;
- b) Citrato de sódio 0,4 N pH 3,95; e
- c) Citrato de sódio 1,0 N pH 6,40.

A identificação dos picos e sua quantificação foi obtida por comparação com uma mistura padrão de aminoácidos e amônia. Os picos não coincidentes não foram calculados.

O padrão de aminoácidos e amônia continha 0,005 μ moles de cada aminoácido em 0,1 mL. Nos aminoácidos neutros, ácidos e na amônia, 0,005 μ moles correspondem a 0,07 mg de N ($0,005 \times 14$); na histidina a 0,21 mg ($0,005 \times 3 \times 14$); na lisina a 0,14 mg ($0,005 \times 2 \times 14$) e na arginina a 0,28 mg de N ($0,005 \times 4 \times 14$).

3.2.10. Evolução das Bases Totais e das Bases Voláteis em Pescados armazenados em Gelo por 13 dias

Lotes de aproximadamente 10 kg de sardinha, cavalinha, pescada, corvina, tilápia e corimbatã foram misturados com gelo na proporção 1:2 (peixe : gelo) em caixas de isopor com drenagem no fundo. O gelo foi adicionado diariamente para compensar as perdas do degelo.

As amostras foram coletadas após 0, 3, 5, 8, 11 e 13 dias e preparadas para as determinações analíticas de acordo com o item 3.2.1.. A tilápia e o corimbatã foram analisados no extrato IV e os peixes marinhos no extrato VII (item 3.2.3.c. e d.).

No caso da sardinha e cavalinha, foram realizados testes paralelos utilizando somente o filé dos peixes, colocados em sacos de

plásticos e acomodados na mesma caixa com gelo em que se encontravam os peixes inteiros.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro problema abordado nesta pesquisa foi escolher o solvente mais adequado para extração do conjunto de substâncias com caráter básico que denominamos "Bases Totais" (BT). A julgar pela literatura, as BT devem ser uma mistura de amônia, aminas primárias, secundárias e terciárias, aminas cíclicas da degradação de nucleotídeos musculares, aminoácidos com caráter básico, creatina, óxido de TMA, alguns íons inorgânicos de caráter básico e outras substâncias de menor importância.

Já que o propósito desta pesquisa é avaliar a basicidade do extrato como um todo através de titulação direta, alguma substância específica deve ser escolhida para acompanhar a eficiência da extração. A trimetilamina (TMA), uma base típica dos pescados, presta-se perfeitamente para esta finalidade. As bases voláteis (BV) que por definição integram as Bases totais (BT), também são úteis como monitores da extração. Por último, a determinação de nitrogênio não protéico (NNP), é um acompanhamento necessário para se ter uma base de comparação entre os extratos.

4.1. ENSAIOS DE EXTRAÇÃO POR SOLVENTES

O QUADRO 3 mostra os resultados da extração de carne de sardinha com etanol (absoluto, adicionado de água e adicionado de água e CaCl_2), com metanol e com o ácido tricloroacético 5% (TCA) que é usado convencionalmente para NNP em pescados.

QUADRO 3 - Teores de Nitrogênio Não Protéico, N-TMA e Bases Voláteis em extratos de sardinha (*Sardinella aurita*), obtidos com diferentes solventes (valores em duplicatas).

Identificação do extrato	NNP/100g	N-TMA/100g	BV/100g
I) Etanol Absoluto	313,2	1,60	15,6
	310,8	1,58	15,4
II) Etanol 75%	349,2	1,56	15,6
	341,3	1,62	15,6
III) Etanol 66%	362,3	1,58	15,4
	367,1	1,61	15,7
IV) Etanol 66% com CaCl_2 2%	318,5	1,60	15,8
	320,2	1,56	15,5
V) Metanol Absoluto	364,6	1,54	15,3
	358,3	1,60	15,6
VI) Ácido tricloroacético 5%	460,5	1,56	15,1
	466,7	1,59	15,2

Do QUADRO 3 , deduz-se que as bases monitoras TMA e BV foram extraídas com igual eficiência em qualquer um dos solventes testados. Portanto, pode-se aceitar que as outras bases sejam também extraídas na mesma extensão. A única variação importante ocorreu com o NNP que foi fortemente influenciado pela natureza do solvente. Considerando que os teores de N-TMA e BV são semelhantes em todos os extratos, então, quanto mais reduzido seja o teor de NNP, menor quantidade de impurezas conterá o extrato. Por essa causa, apenas os extratos I e IV continuaram sendo pesquisados. O extrato VI foi mantido como maneira de comparação, em alguns ensaios posteriores.

4.2. LIBERAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS BÁSICAS POR ÁLCALIS SÓLIDOS

A titulação imediata dos extratos I e IV com HCl 0,02 N, não registrou gasto de ácido, pois o pH destes estava em torno de 5,9, na zona de viragem do indicador "púrpura de bromocresol" (item 3.2.3.d.). Entretanto, a presença de TMA e BV ficou confirmada por testes específicos, logo as bases estão, provavelmente, neutralizadas por compostos anfóteros ou por ácidos orgânicos (acético, propiônico e especialmente lático) dos tecidos. Para evidenciá-las é preciso liberá-las, porém não por destilação na presença de NaOH, pois nesse caso só seriam avaliadas apenas as Bases Voláteis. É preciso adicionar um álcali, que possa ser removido por filtração ou centrifugação, para que o mesmo não consuma HCl, na titulação, falseando os resultados. A condição primária é que o alcalinizante para liberação das Bases Totais seja praticamente insolúvel no

meio etanólico, fornecendo íons OH^- de forma estritamente controlada. Entre as substâncias que podem ser escolhidas, temos: CaCO_3 , ZnO , MgO e Ca(OH)_2 . Para verificar o comportamento destes agentes, os extratos I e IV foram tratados com 1 g de cada uma das substâncias alcalinizantes, e processados para titulação das Bases Totais, conforme o item 3.2.3.d.. O QUADRO 4 apresenta os valores da basicidade dos extratos de sardinha com os quatro alcalinizantes acompanhados dos brancos respectivos para se conhecer a contribuição do álcali puro na basicidade total.

QUADRO 4 - Basicidade total dos extratos I e IV de sardinha (em mL de HCl 0,02N/10 mL do extrato), obtida com diversos alcalinizantes sólidos.

Álcali	Extrato I			Extrato IV		
	Branco	Amostra	BT	Branco	Amostra	BT
	(b)	(a)	(a-b)	(b)	(a)	(a-b)
CaCO_3	0,0	0,0	0,0	0,02	0,8	0,6
ZnO	0,05	4,78	4,73	0,15	5,2	5,05
MgO	0,05	5,80	5,75	0,28	8,8	8,52
Ca(OH)_2	0,05	6,20	6,15	0,35	11,0	10,65

Do QUADRO 4 deduz-se que o CaCO_3 não conferiu aos extratos nenhuma basicidade, provavelmente pelo limitado teor de água no etanol. Os outros agentes apresentaram boas perspectivas de aproveitamento.

mento, especialmente se usados com o extrato I que deu brancos pequenos e uma certa semelhança no valor das BT. Pelo contrário, o extrato IV, que contém mais água, deu brancos muito altos, acusando uma dissolução excessiva do álcali.

4.3. AValiação da Eficiência da Extração e da Liberação das BT

Se aceitarmos que os valores do extrato I estejam mais próximos da realidade, qual dos três valores (ZnO , MgO e Ca(OH)_2) representa melhor o teor das Bases Totais? Pelo fato do teste ser novo, não existe, por enquanto, um valor numérico para servir de referência. O único elemento orientador pode ser a adição de uma base conhecida no extrato etanólico e avaliando a sua contribuição na basicidade total antes e após tratamento com os diversos álcalis.

O QUADRO 5 mostra os resultados da adição de NH_4Cl a um extrato de sardinha, obtido pelo método I (contém aproximadamente 80% de etanol). Os brancos respectivos aparecem detalhados em cada caso (Métodos item 3.2.5.).

Os resultados do QUADRO 5 revelam que a liberação do N básico do NH_4Cl por alcalinização, com ZnO e MgO , à temperatura ambiente, é incompleta e ficou longe do valor 2,8, correspondente à quantidade absoluta do N. Com Ca(OH)_2 a recuperação foi excelente ficando acima de 90%, tanto para o sistema puro, quanto para o sistema com pescado. Neste último porém, a recuperação é aproximadamente 2,5% inferior ao sistema puro.

Considerando que a recuperação do N básico do NH_4Cl com Ca(OH)_2 é quase que total, pode-se aceitar que a recuperação de outras bases seja também elevada, pois elas têm cadeias alifáticas (histami

na, putrecina), ou têm um caráter orgânico mais acentuado por tratar-se de bases cíclicas, esta condição aumentaria a sua solubilidade em etanol.

QUADRO 5 - Recuperação de N Básico adicionado na forma de NH_4Cl e alcalinizado com NaOH , ZnO , MgO e Ca(OH)_2 . A basicidade (em duplicata) está expressa em mL de HCl 0,02N.

Misturas	Basicidade dos Tratamentos com			
	Destilação com NaOH	ZnO	MgO	Ca(OH)_2
1. NH_4Cl +etanol 80% (A_1)	—	2,12 2,08	2,47 2,51	2,68 2,72
2. Etanol 80% (B)	—	0,02 0,01	0,05 0,05	0,06 0,06
3. Extrato sardinha (M_1)	—	4,63 4,58	5,52 5,58	6,05 6,05
4. NH_4Cl + Extrato sardinha (M_2)	—	6,60 6,69	7,85 7,80	8,66 8,62
5. NH_4Cl + NaOH (A_2)	2,80 2,80	—	—	—

Recuperação de N básico adicionado em soluções puras (%)	—	74,46	84,28	94,28
Recuperação de N básico adicionado em extrato de peixe (%)	—	72,85	81,25	92,50

4.4. INFLUÊNCIA DA PERCENTAGEM DE ÁGUA DO ETANOL NO VALOR DAS BT

Um parâmetro da maior importância para liberação das substâncias básicas, parece ser o teor de água na fase etanólica. No extrato I esse valor está em torno de 20% e no extrato IV em torno de 45% (Métodos item 3.2.4.). No QUADRO 4, os valores das BT, obtidos com o extrato IV, foram maiores que os do extrato I, parecendo indicar que a presença de mais água admite quantidades maiores de material anfótero, que causa uma viragem mais demorada na zona de pH 6,0 - 6,3 (cor verde).

Para esclarecer a influência da percentagem de água, foi feito um ensaio mudando a concentração de água em forma progressiva, seja por adição de etanol no extrato IV ou adição de água no extrato I (Métodos item 3.2.6.). Os resultados são mostrados na FIGURA 7.

Do exposto na FIGURA 7, deduz-se que ambas as curvas convergem para uma zona de valores mais ou menos constante de BT, zona compreendida entre 20 e 26% de água. Acima destas percentagens, os valores de BT são algo irregulares apresentando um aumento mais acentuado. Valores abaixo de 20% não foram testados, pois o uso de mais etanol absoluto na extração carrega muitos lipídios que dão soluções turbidas durante a titulação.

A FIGURA 7 mostrou também que se adicionar suficiente etanol, para diminuir o teor de água no extrato IV, os seus valores tornam-se semelhantes aos do extrato I, podendo ser usado para as determinações de BT. De fato, este extrato foi usado nos primeiros estudos sobre evolução de frescor em peixes de água doce.

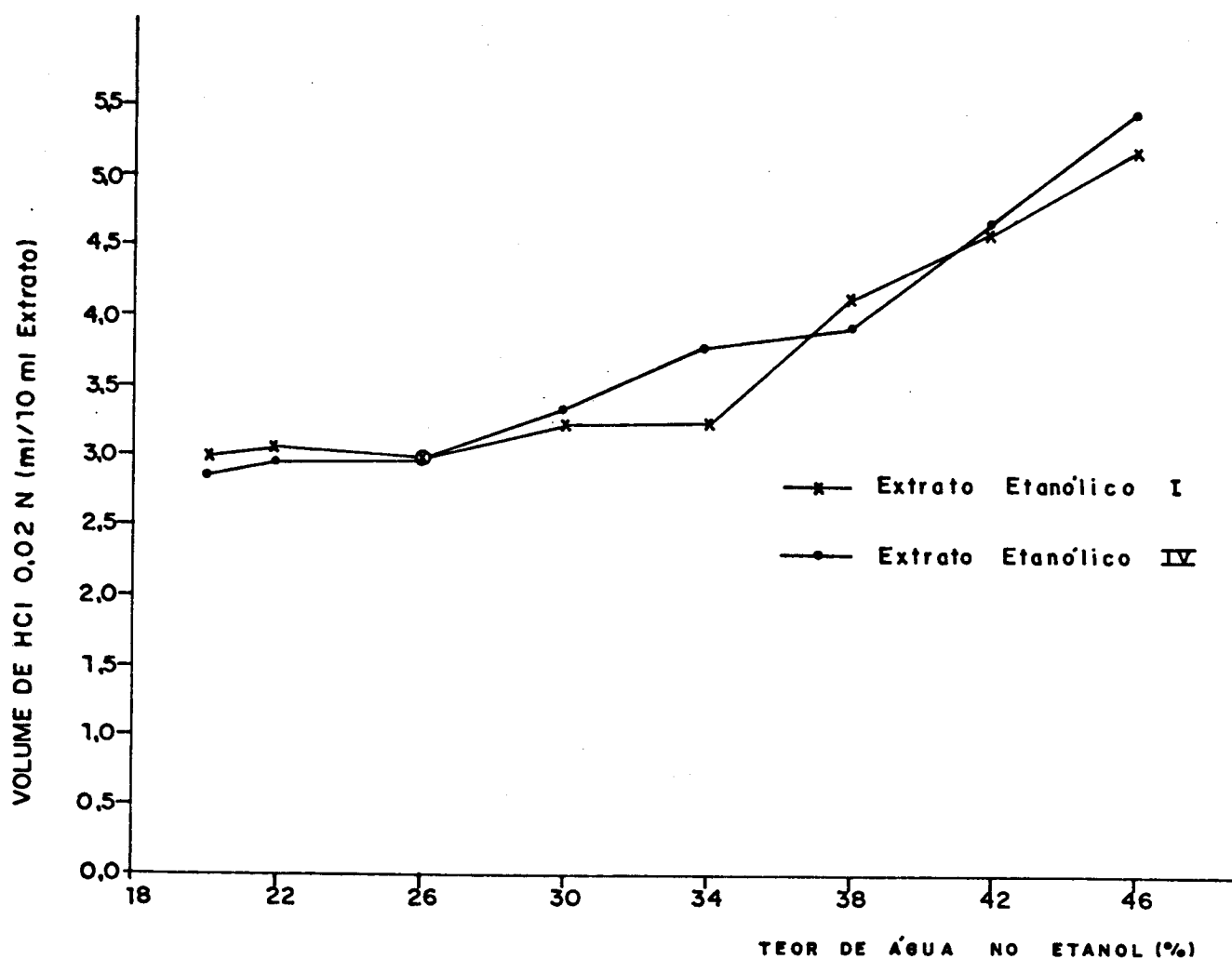


FIGURA 7 - Influência do teor de água do etanol na quantidade de substâncias básicas liberadas por agitação com Ca(OH)_2 .

4.5. INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE ALCALINIZANTE NO VALOR DAS BT

Em todas as provas até aqui detalhadas, foi usado 1 g de MgO ou Ca(OH)_2 para 20 mL do extrato de peixe. Entretanto, um estudo posterior mostrou que não era necessário tanta quantidade, como é mostrado na FIGURA 8.

Da FIGURA 8 percebe-se que já com 0,3 g de MgO ou Ca(OH)_2 , são obtidos valores mais ou menos constantes de BT. Com quantidades acima de 1,5 g, há uma ligeira diminuição nos valores das BT, fato que talvez é devido à adsorção das substâncias básicas no excesso de álcali sólido. Na mesma FIGURA, mostra-se, com fins comparativos, o que ocorre com o extrato em TCA (extrato VI) quando a ele é adicionado suficiente etanol, para atingir um teor de água próximo de 20% e logo adicionado MgO ou Ca(OH)_2 , para liberar as bases.

Surpreendentemente, o extrato em TCA, com etanol, permitiu titular as BT, dando valores algo maiores que os obtidos na extração com etanol puro.

4.6. INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CONTATO (AGITAÇÃO) DO ALCALINIZANTE NO VALOR DAS BT

Junto com o estudo da quantidade mínima de alcalinizante, foi estudado o tempo de agitação dos extratos, para se atingir a estabilização no teor de BT.

Na FIGURA 9 aparecem as curvas de titulação dos extratos desde 2,5 minutos até 60 minutos.

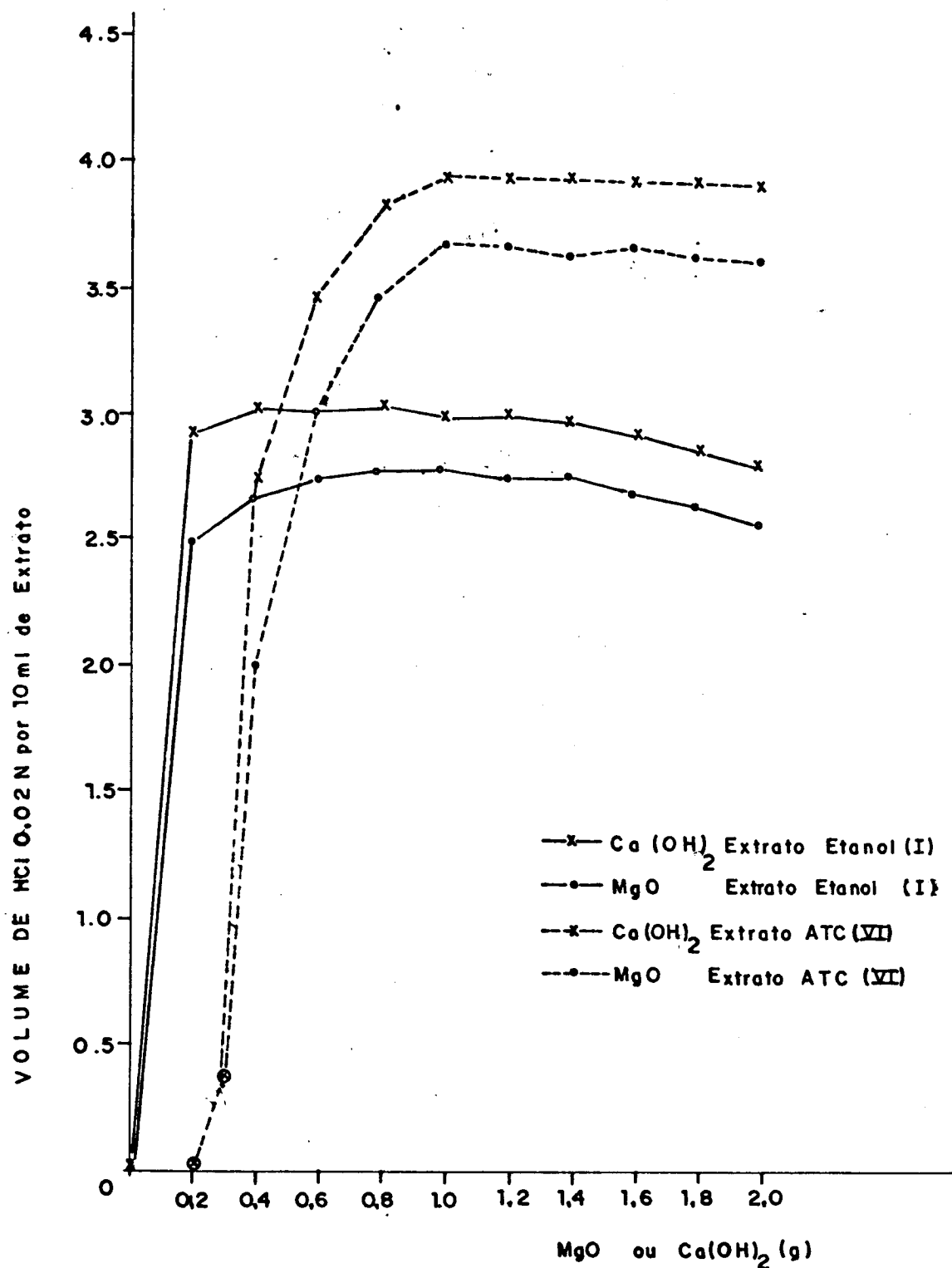


FIGURA 8 - Determinação da quantidade mínima de alcalinizante para liberação das substâncias básicas (BT) do extrato tri-cloracético e etanólico.

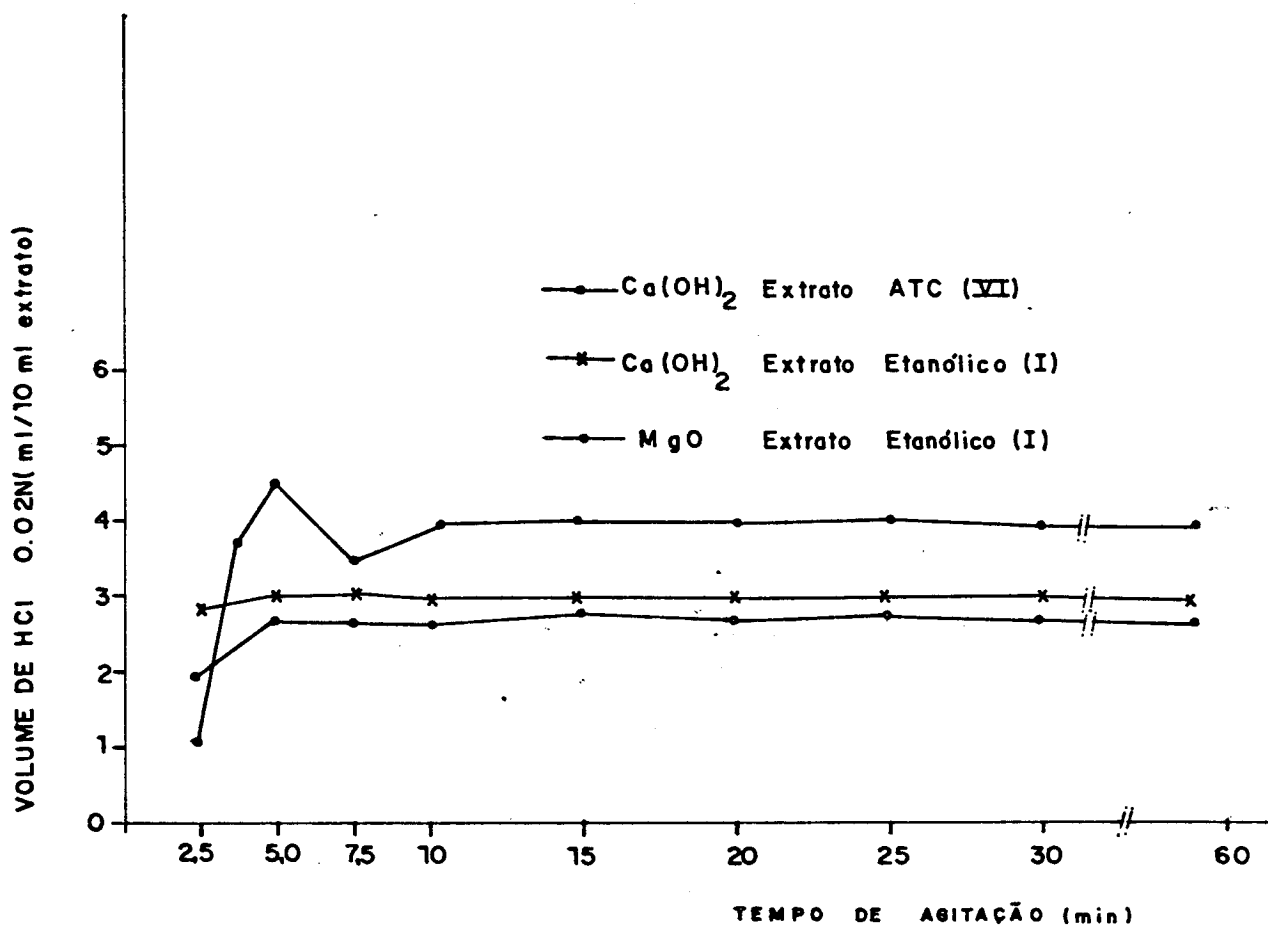


FIGURA 9 - Influência do tempo de agitação na quantidade de substâncias básicas liberadas com Ca(OH)_2 e MgO .

Comprovou-se que não é necessário agitar mais de 10 minutos, pois a constância na basicidade se consegue já nos primeiros 5 minutos. Aparentemente, a quantidade de Ca(OH)_2 ou MgO que se dissocia no etanol com 19% de água, é tão pequena que o equilíbrio se atinge quase que instantaneamente.

4.7. MODIFICAÇÃO DO PROCESSO PARA REDUÇÃO DAS ETAPAS ANALÍTICAS

Até aqui, o procedimento analítico para BT tem constado de três etapas: extração, liberação e titulação; sendo de qualquer modo mais simples que a determinação de BV, no qual a liberação é feita por destilação. Foi pensado que se a liberação das BT pudesse ser feita durante a própria extração, o processo ficaria reduzido apenas a duas etapas. Seria um teste realmente mais rápido e simples que as BV. Para tanto, o Ca(OH)_2 foi adicionado junto com o pescado e o etanol (3.2.3.d.). Inicialmente foram analisados quatro espécies de peixes registrando-se o NNP, as BV, TMA e as BT. O método de duas etapas foi realizado junto com o de três etapas. Os resultados aparecem no QUADRO 6.

Do QUADRO 6 pode-se concluir o seguinte:

- a) O método rápido extrai menos NNP em todos os peixes.
- b) Os dois métodos extraem, inicialmente, quantidades semelhantes de BV e TMA. Porém, no método de três etapas, aproximadamente 7,5% são perdidos, provavelmente retidos no próprio Ca(OH)_2 sólido, ou no papel de filtração.
- c) As determinações das BT, sendo quase que semelhantes em ambos os métodos, apresentam-se, em média, 6,6% mais altas no método rápido.

QUADRO 6 - Comparação entre a determinação de BT em extratos de peixes, pelo método: (extração + liberação)→ (titulação) e pelo método (extração)→ (liberação)→ (titulação). Alcalinizante: Ca(OH)_2 .

Sequência: (Extração + liberação)→ (titulação) (Extrato VII)

Compostos determinados	Cavalinha	Corvina	Sardinha	Serra
NNP (mg/100 g)	271,6	160,5	217,2	261,4
BV (mg/100 g)	16,2	18,6	14,2	21,4
N-TMA (mg/100 g)	1,70	1,26	1,00	1,25
BT (mg/100 g)	113,1	64,7	75,2	92,4

Seqüência: (Extração)→ (liberação)→ (titulação) (Extrato I)

Compostos determinados	Cavalinha	Corvina	Sardinha	Serra
NNP (mg/100 g)	336,9	216,9	244,0	338,9
BV (mg/100 g) *	15,9	18,8	14,20	20,8
BV (mg/100 g) **	15,0	17,5	13,1	19,3
N-TMA (mg/100 g) *	1,65	1,19	0,96	1,19
N-TMA (mg/100 g) **	1,60	1,12	0,96	—
BT (mg/100 g)	107,2	60,2	70,4	86,6

* após a 1.^a filtração

**após tratamento com Ca(OH)_2 , 2.^a filtração.

As constatações recém enumeradas permitem estabelecer que o método rápido não é apenas mais vantajoso quanto a tempo e simplicidade, senão, também, quanto a eficiência da extração, pois extrai completamente as BV e a TMA com uma menor quantidade de material acompanhante (NNP). Aparentemente a presença de Ca(OH)_2 favorece a extração e liberação às bases, por complexação com as proteínas musculares, deslocando a amônia, TMA e outras substâncias básicas, para o meio líquido, já que mesmo que as bases são solúveis, poderiam ficar ligadas eletrostaticamente nos sítios iônicos das proteínas.

4.8. ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE COMPOSIÇÃO DO EXTRATO DAS BT

A composição das BT é com certeza muito complexa e não se pretende, nesta pesquisa, o detalhamento dos componentes individuais. Como uma introdução ao problema, foi feito um exame de quatro extratos típicos de pescado por cromatografia de troca iônica, avaliando os compostos eluídos, por reação com ninidrina; desta forma se teria uma idéia da quantidade de substâncias com grupos amino primários que existem nos extratos.

O QUADRO 7 mostra as quantidades de N contribuídas por aminoácidos e amônia. Foi aplicado 1 mg de N de extrato etanólico de pescado (método de três etapas). As condições do experimento e as conversões para nitrogênio, foram feitas de acordo com o item 3.2.9.

O QUADRO 7 revelou que dos compostos que reagem com ninidrina, a amônia e a histidina foram os mais importantes. Para interpretação dos resultados ali contidos, é mais conveniente formar

QUADRO 7 - Teores de N-de aminoácidos e N-de amônia (em microgramas) contidos em 1.000 microgramas de N não protéico, de extratos de pescado, obtidos por extração e liberação das bases totais com Ca(OH)_2 .

Aminoácido (μg de N)	Pescada	Corvina	Sardinha	Corimbata
Ácido aspártico	-	-	-	-
Treonina	1,7	3,5	5,8	7,3
Serina	2,3	4,0	5,3	10,5
Ácido glutâmico	9,9	6,4	7,0	7,9
Prolina	-	-	-	-
Glicina	7,5	21,5	9,7	12,0
Alanina	11,9	23,8	31,5	27,5
1/2 Cistina	-	-	-	-
Valina	-	-	-	-
Metionina	6,2	4,3	4,3	3,6
Isoleucina	4,3	3,7	5,6	6,4
Leucina	8,0	8,9	9,6	10,9
Tirosina	4,9	3,3	4,1	4,1
Fenilalanina	4,7	2,7	5,1	4,9
Histidina	17,7	12,6	475,8	100,3
Lisina	21,7	17,8	27,1	26,4
Amônia	323,1	251,2	107,6	122,1
Arginina	8,0	7,8	13,7	18,3
Total (μg N)	431,9	371,5	709,2	362,2

quocientes entre os vários compostos registrados e a quantidade de N não protéico aplicado para análise cromatográfica; tais relações aparecem no QUADRO 8 e permitem as considerações que se seguem.

A relação 1, do QUADRO 8, revela que apenas uma fração do N não protéico reagiu com a ninidrina, especificamente aquelas contendo grupos amino primários, pois é um fato comprovado (MOLTE-NO *et alii*, 1967) que a dimetilamina e a trimetilamina (aminas secundárias e terciárias) não reagem com a ninidrina. Além de TMA, que foi quantificada nos extratos pelo método de DYER (1945), pode-se esperar que a maioria dos derivados da degradação de nucleotídios (bases púricas livres, inosina, hipoxantina, xantina e outros) não sejam registrados com ninidrina. Entretanto, estes compostos poderiam estar contribuindo com basicidade total. A possível contribuição dos diversos compostos será reexaminada através desta discussão.

Voltando ao QUADRO 8 percebe-se que os valores da relação 1, para pescada, corvina e corimbatã, mostram que apenas entre 36,22 e 43,19% do N não protéico aplicado na coluna, reagiu com ninidrina. Pelo contrário, na sardinha mais de 70% reagiu com ninidrina. A sardinha pertence ao grupo de peixes com teor elevado de histidina livre (SIMIDU, 1961] junto com o bonito (*Euthynnus alleteratus*), a serra (*Sarda sarda*], a cavalinha (*Scomber scombrus*) e outros. Esta característica explica, também, o valor da relação 5 que atingiu 79,09%. Isto significa que na sardinha mais de 3/4 do N de aminoácidos, corresponde a N da histidina. Este resultado concorda com os dados de SAKAGUCHI (1982] que encontrou 1.160 mg de histidina por 100 g de músculo de yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), enquanto que a alanina, glicina, lisina e treonina apenas se encontraram entre 10 e 30 mg/100g. Por outra parte, ARARAKI & SUYAMA (1966)

relataram que no músculo claro do yellowtail a histidina contribuiu com 53% do NNP.

QUADRO 8 - Relações percentuais entre N-amoniaco (NA), N não proteico injetado na coluna (NNP), soma do N de aminoácidos (NAA), soma do N reagido com ninidrina (SNN), N da histidina (NH) e N-TMA nos extratos etanólicos (IV) de diversos pescados.

Relações	Pescada	Corvina	Sardinha	Corimbata
1. $\frac{\text{SNN}}{\text{NNP}} \times 100$	43,19	37,15	70,92	36,22
2. $\frac{\text{NA}}{\text{NNP}} \times 100$	32,31	25,10	10,76	12,21
3. $\frac{\text{NA}}{\text{SNN}} \times 100$	74,81	67,62	15,08	33,71
4. $\frac{\text{NH}}{\text{NNP}} \times 100$	1,77	1,26	47,58	10,03
5. $\frac{\text{NH}}{\text{SNN}} \times 100$	4,10	3,39	79,09	27,69
6. $\frac{\text{NAA}}{\text{NNP}} \times 100$	10,88	12,03	60,20	24,01
7. $\frac{\text{NAA} - \text{NH}}{\text{NNP}} \times 100$	9,11	10,25	12,58	13,97
8. $\frac{\text{N} - \text{TMA}}{\text{NNP}} \times 100$	1,92	1,60	1,02	0,08

Nos peixes brancos, pescada e corvina, o N da histidina foi insignificante (em torno de 4%). O corimbatã, entretanto, apresentou um teor de histidina livre relativamente alto (29,69%).

A relação 2 mostra que o N-amoniaco constitui em torno de 30% do N não protéico dos extratos de corvina e pescada, sendo que para os outros peixes, o N-amoniaco ficou em torno de 10%. Pode-se aceitar que na determinação da basicidade total de corvina e pescada, a amônia possa ser o mais importante contribuinte individual das BT, uma situação semelhante a que ocorre com as BV, porém guardadas as devidas proporções, pois nesta última, a amônia perfaz mais de 90% (MOLTENO *et alii*, 1967). Na sardinha, o componente principal das BT não seria a amônia e sim a histidina.

Com respeito à contribuição de outros aminoácidos livres, (relação 7), pode-se inferir que eles devem ter um papel irrelevante no valor das BT, pois a sua contribuição ficou apenas entre 9,11 e 13,97%. Os aminoácidos mais abundantes, excluindo-se a histidina, são: lisina e alanina. A glicina e aminoácidos neutros, provavelmente, são responsáveis pelo consumo de ácido na zona de viragem do indicador púrpura de bromocresol, de verde escuro para verde claro que corresponde a um pH entre 6,3 e 5,8.

Os aminoácidos livres registrados nos cromatogramas poderiam corresponder à fração de aminoácidos que não formaram complexos com os íons Ca^{++} , já que ficou evidente que o tratamento com Ca^{++} diminuiu notavelmente o conteúdo de N não protéico nos filtrados, indicando complexação. Outra hipótese, é que os compostos cálcicos tenham se formado, porém apresentam ainda uma boa solubilidade em etanol. O comprometimento do grupo carboxilo com o Ca^{++} , tornaria o aminoácido numa base que estaria sendo avaliada na determinação

das BT. A diminuição de NNP, após o tratamento com Ca(OH)_2 pode não ser devida à complexação dos aminoácidos senão à precipitação de nucleotídeos e intermediários contendo resíduos de fosfato. O Ca^{++} precipitaria este resíduo carregando a molécula inteira de ATP, ADP, AMP, IDP, IMP e outros que contêm vários átomos de N na sua estrutura. Desta maneira, ficariam solúveis apenas as bases livres, adenina e guanina. SHEWAN *et alii* (1957) relataram que o tratamento do NNP com BaCl_2 em pH 8.0 permitiu remover a totalidade de ribose ligada a fosfato, filtrando apenas a ribose livre; uma situação bastante semelhante à precipitação com Ca^{++} proposta na presente pesquisa.

Na relação 8, do QUADRO 8, pode-se apreciar que a contribuição do N de TMA é irrelevante na soma das bases totais.

Finalmente, deve ser mencionado que em todos os aminogramas, há um composto não identificado que elui rapidamente antes do ácido aspártico e que reage com a ninidrina. Tal composto aparece com a letra x, nos aminogramas da FIGURA 10. A corvina apresenta aproximadamente duas vezes mais composto x que os outros peixes. Pela posição parece tratar-se de creatina ou taurina, um aminoácido não protéico muito abundante em pescados (SAKAGUCHI *et alii*, 1982).

Todos os outros picos apresentam correspondência com os aminoácidos do padrão.

Já que o objetivo desta tese é apenas avaliar o potencial da determinação da basicidade total (BT), como teste de frescor rápido, um trabalho de identificação mais detalhado será abordado no futuro, após confirmar se esta determinação é suficientemente sensível para acusar mudanças deteriorativas. Por enquanto, pode-se

Identificação dos Picos

- | | | |
|--------------------|------------------|---------------------|
| 1. Ácido aspártico | 7. Valina | 13. Histidina |
| 2. Treonina | 8. Metionina | 14. Lisina |
| 3. Serina | 9. Isoleucina | 15. Amônia |
| 4. Ácido glutâmico | 10. Leucina | 16. Arginina |
| 5. Glicina | 11. Tirosina | X. Não Identificada |
| 6. Alanina | 12. Fenilalanina | |

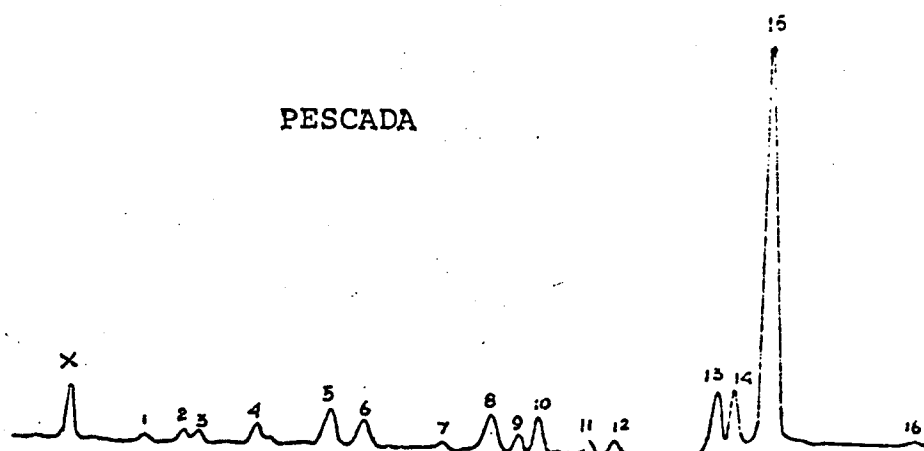
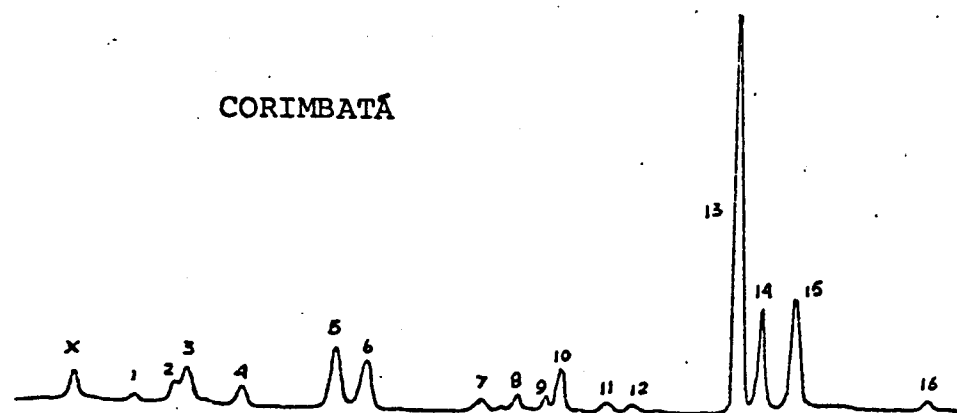
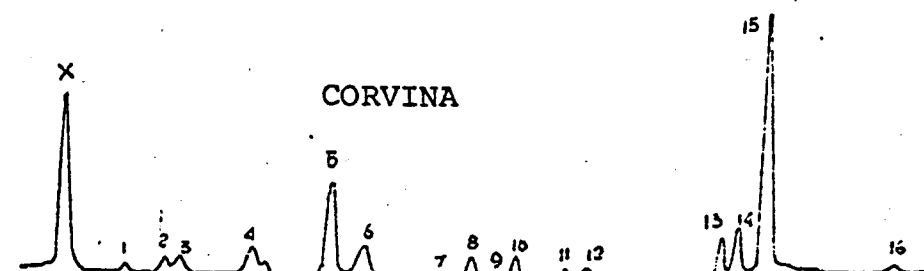
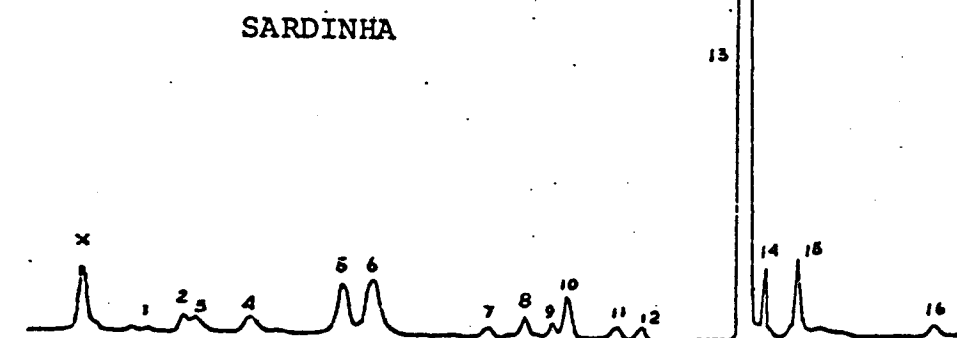


FIGURA 10 - Separação dos compostos que reagem com ninidrina por cromatografia de troca iônica no aparelho analisador de aminoácidos. A identificação dos extratos e dos compostos aparece no desenho.

estabelecer que o teste aqui discutido com certeza determina: amônia, histidina, lisina, alguns aminoácidos neutros e trimetilamina. Há, ainda, uma parcela de N, pelo menos igual a já conhecida, cujos compostos não foram identificados. Há uma grande probabilidade que esses compostos sejam óxido de TMA não reduzidos para TMA livre, nucleotídeos e derivados, dipeptídeos próprios do músculo como anserina e carnosina (SAINCLIVIER, 1983), histamina da descarboxilação da histidina (BALDINI, 1982 e WADA *et alii*, 1982), creatina (CUTTING, 1953, IKEDA, 1980), cadaverina, putrescina, agmatina e espermina da atividade bacteriana sobre as proteínas relatada por RITCHIE (1980).

A contribuição de cada um destes compostos no valor das BT depende da quantidade presente e de sua basicidade relativa. Segundo THORNTON & NEILSON (1966), as bases heterocíclicas com a estrutura da piridina são bases fracas com constantes de dissociação (K_b) em torno de 10^{-9} . Sua basicidade é menor que a das aminas alifáticas que apresentam valores de K_b entre 10^{-3} e 10^{-4} . Os autores acima citados relatam valores de $4,4 \times 10^{-4}$, $5,1 \times 10^{-4}$ e $0,6 \times 10^{-4}$ para metilamina, dimetilamina e trimetilamina, respectivamente. Para amônia, eles relataram um valor de K_b de $1,8 \times 10^{-4}$. A creatina e o óxido de TMA, segundo CUTTING (1953) são bases fracas com valores de K_b entre 10^{-10} e 10^{-9} , respectivamente. Já os aminoácidos básicos, histidina e lisina, são bases menos fortes que as aminas, porém mais fortes que os monoaminoácidos.

Este conjunto de substâncias, a maior parte de caráter neutro ou básico, torna-se ainda mais básico durante a deterioração de pescado armazenado em gelo.

4.9. EVOLUÇÃO DAS BT E DAS BV EM PEIXES ARMAZENADOS COM GELO

A finalidade destes testes foi acompanhar as mudanças das BT em peixes armazenados em gelo, para verificar se este método segue a mesma evolução das BV. É importante verificar se o teste das BT reflete a deterioração normal que ocorre ao longo da estocagem.

Os testes com peixes de água doce foram feitos com extratos do tipo IV, por terem sido realizados na primeira parte desta pesquisa, quando ainda não tinha sido desenvolvido o método rápido (extrato VII). Os testes com peixes marinhos foram realizados com o extrato VII. Os resultados aparecem nos QUADROS 9, 10, 11 e 12; e nas FIGURAS 11, 12, 13 e 14.

QUADRO 9 - Evolução das BT e das BV em tilápia híbrida (cruzamento de *Tilápia hornorum* macho com *T. nilótica* fêmea) e corimbata (*Prochilodus reticulatus*), estocados em gelo.

Estocagem (gelo)	BT (mg N/100 g)		BV (mg N/100 g)		Relação	$\frac{BV}{BT} \times 100$
	corim- batã	tilã- pia	corim- batã	tilã- pia		
Dias						
1	26,46	22,56	14,32	13,15	54,11	58,29
3	23,56	17,80	9,91	12,05	42,06	67,69
5	22,68	16,92	9,91	10,96	43,69	64,77
8	22,68	24,44	13,77	11,18	60,71	45,74
11	30,24	30,08	15,42	9,31	50,99	30,95
13	35,91	34,72	22,03	10,63	61,35	30,62

Os resultados do QUADRO 9 aparecem, em forma de gráficos, na FIGURA 11.

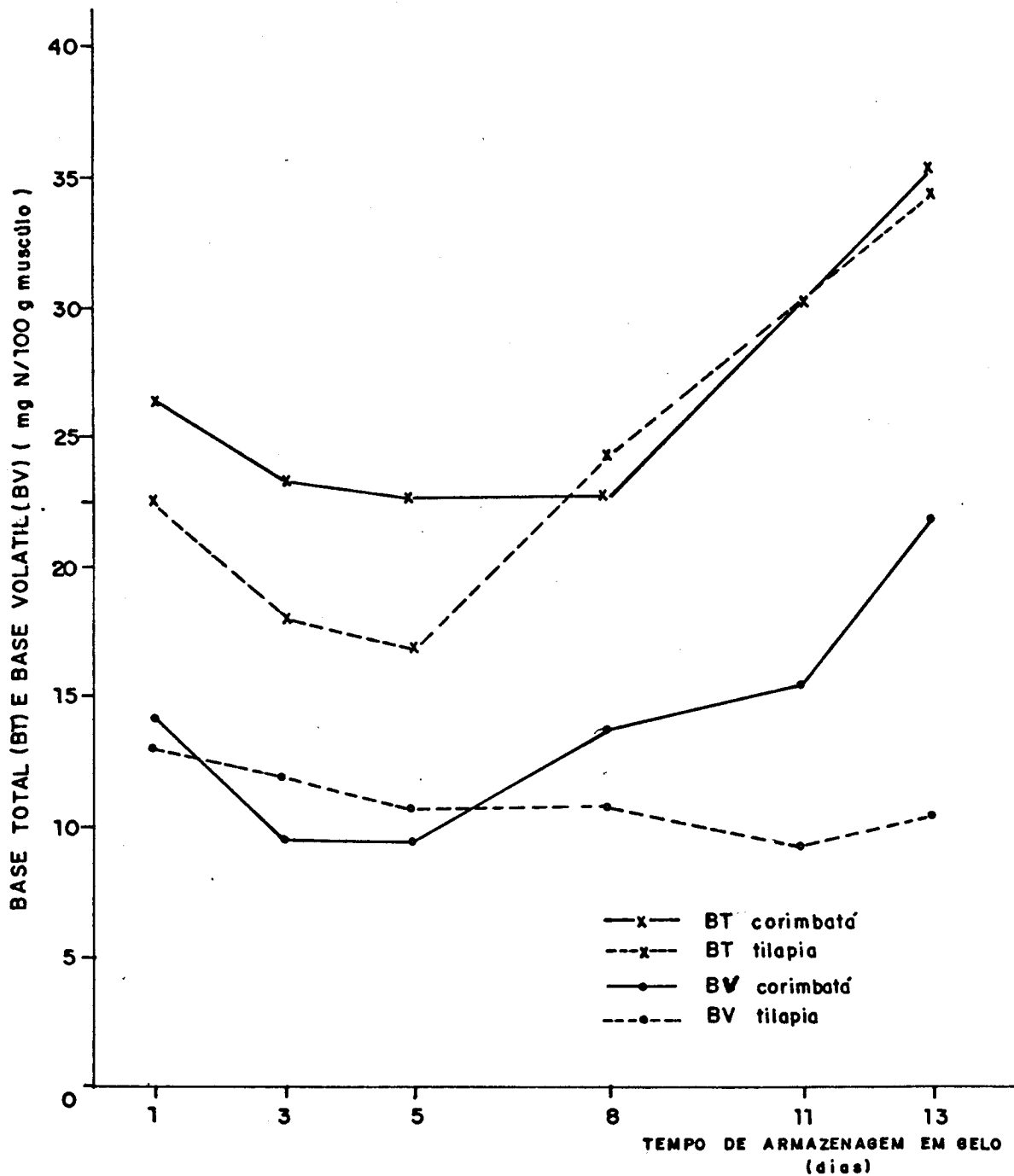


FIGURA 11 - Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de tilapia híbrida (cruzamento de tilapia hornorum macho com tilapia nilótica fêmea) e corimbata.

QUADRO 10 - Evolução das BT e das BV em sardinha inteira (*Sardinella aurita*) estocada em gelo, e filé de sardinha em embalagem plástica mergulhada em gelo.

Estocagem (gelo)	BT (mg N/100 g)		BV (mg N/100 g)		Relação	$\frac{BV}{BT} \times 100$
	Dias	Inteira	Filé	Inteira		Filé
1	45,38	49,36	14,05	15,22	30,96	30,83
3	58,97	55,85	14,83	15,38	25,15	27,53
5	63,80	67,50	15,10	16,85	23,66	24,96
8	83,55	88,13	21,70	21,07	25,97	23,90
11	91,08	118,03	23,95	25,80	26,29	21,85
13	94,90	137,92	26,20	30,32	27,61	21,98

Os resultados do QUADRO 10 aparecem, em forma de gráficos, na FIGURA 12.

QUADRO 11 - Evolução das BT e das BV em cavalinha inteira (*Scomber scombrus*) estocada em gelo, e filé de cavalinha em embalagem plástica mergulhada em gelo.

Estocagem (gelo)	BT (mg N/100 g)		BV (mg N/100 g)		Relação	$\frac{BV}{BT} \times 100$
Dias	Inteira	Filé	Inteira	Filé	Inteira	Filé
1	58,29	51,33	16,80	15,38	28,82	29,96
3	55,33	54,68	16,90	14,26	30,54	26,08
5	86,96	79,33	21,17	16,00	24,34	20,17
8	95,38	118,00	23,43	25,36	24,56	21,49
11	108,23	139,12	26,00	28,80	24,02	20,70
13	133,90	180,50	28,16	31,05	21,03	17,20

Os resultados do QUADRO 11 aparecem, em forma de gráficos, na FIGURA 13.

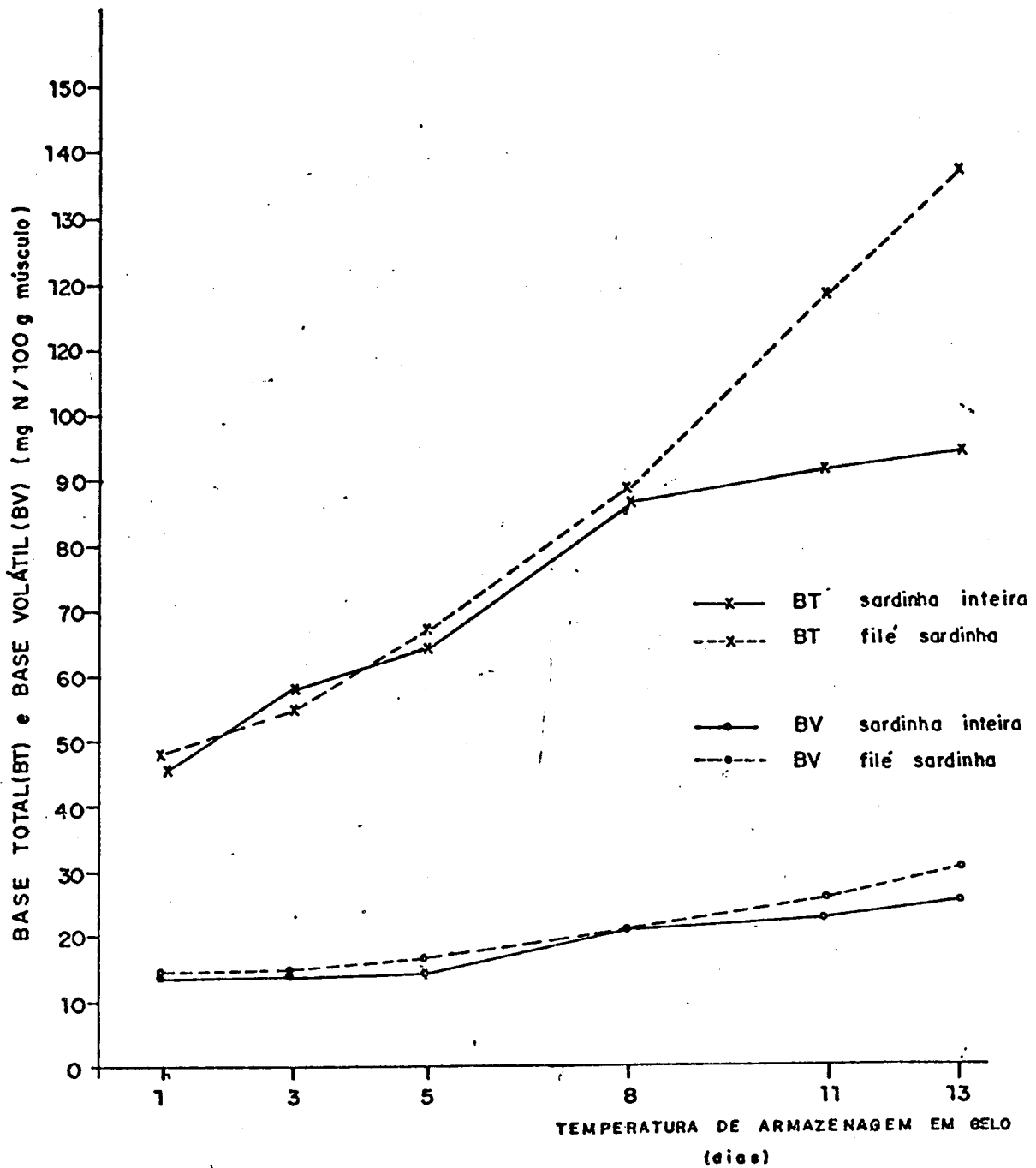


FIGURA 12 - Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de sardinha armazenada em gelo.

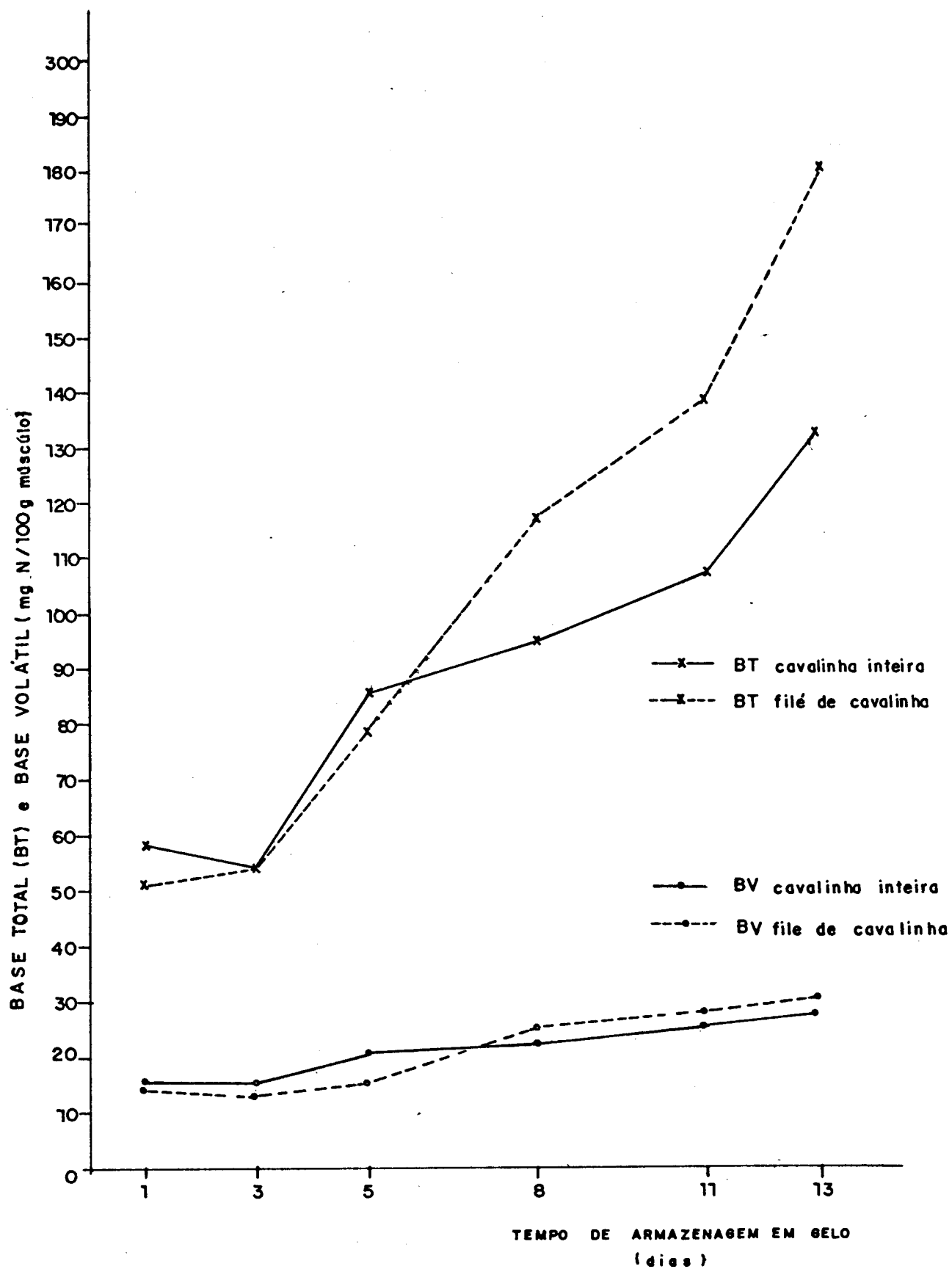


FIGURA 13 - Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de cavallina armazenada em gelo.

QUADRO 12 - Evolução das BT e das BV em pescada (*Macrodon ancylodon*) e corvina (*Micropogon furnieri*) estocadas em gelo.

Estocagem (gelo)	BT (mg N/100 g)		BV (mg N/100 g)		Relação $\frac{BV}{BT} \times 100$	
Dias	Pescada Corvina		Pescada Corvina		Pescada	Corvina
1	35,26	54,02	12,63	13,60	35,82	27,77
3	36,60	50,16	13,86	13,60	37,86	27,11
5	31,38	53,60	12,89	15,12	41,08	28,20
8	37,80	59,60	18,63	18,69	49,29	31,05
11	53,60	69,80	25,00	23,42	43,69	35,57
13	75,90	77,64	36,90	35,92	47,33	40,00

Os resultados do QUADRO 12 aparecem, em forma de gráficos, na FIGURA 14.

A observação dos quadros anteriores e das figuras respectivas, permite formular as seguintes considerações:

Na tilápia (QUADRO 9, FIGURA 11), o teste das BT foi claramente mais sensível para acusar mudanças bioquímicas ou microbiológicas no decorrer da estocagem, observando-se uma tendência mais acentuada a partir do oitavo dia. As BV em contraste, apresentaram um comportamento estranho com tendência à diminuição. Como resultado deste fato, a relação BV/BT diminuiu desde 58,29 para 30,62%, o que

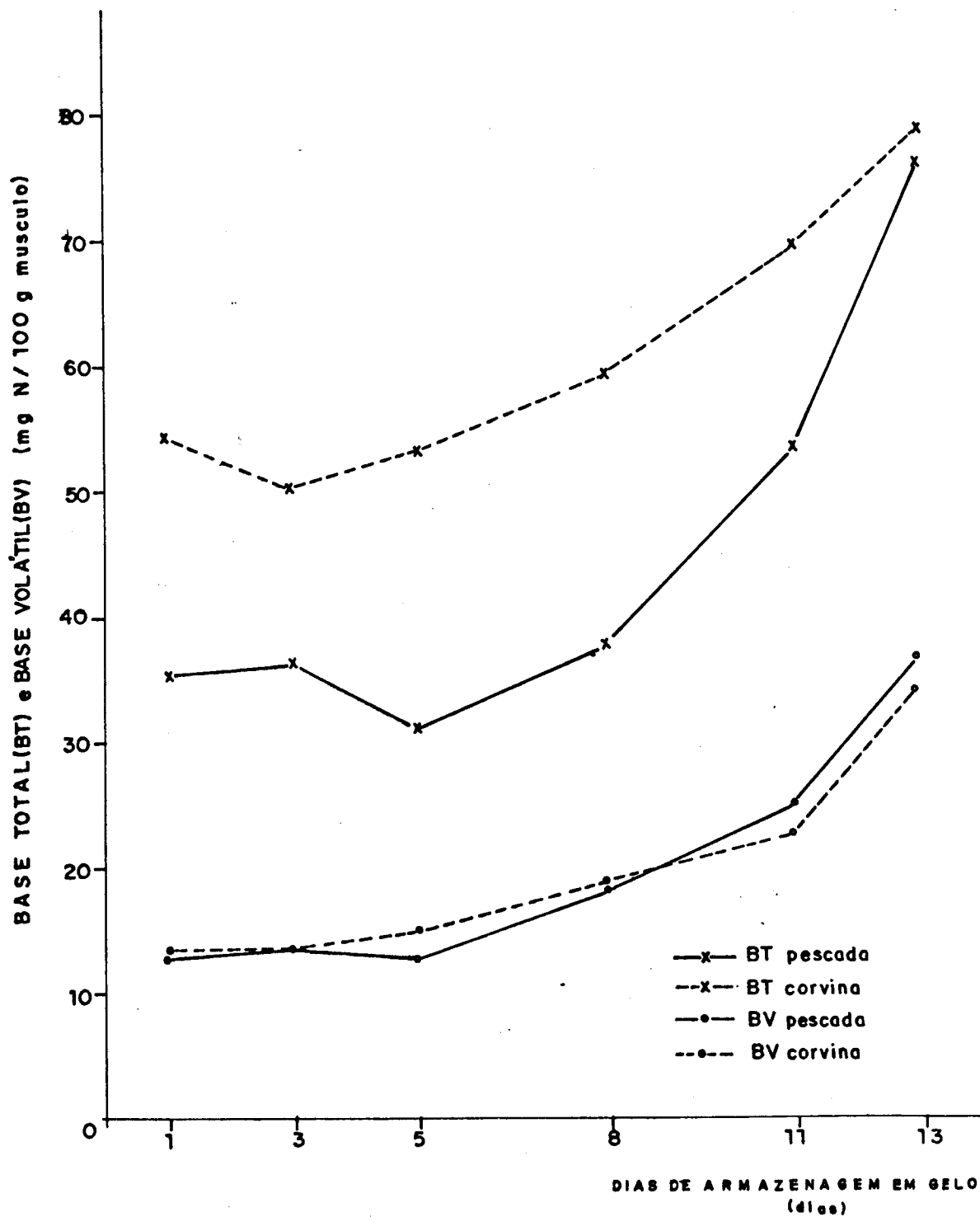


FIGURA 14 - Evolução das Bases Totais e Bases Voláteis de pescada e corvina armazenadas em gelo.

indica que a deterioração deste peixe não se caracteriza pelo acúmulo de amônia e aminas voláteis, senão por substâncias básicas não voláteis. A pouca utilidade do teste das bases voláteis para evidenciar mudanças em peixes de água doce estocados com gelo, tem sido comentada por vários autores (KUAYE, 1982; MAIA, 1980 e NETO, 1984) e pode-se especular que o teste das BT poderia preencher a necessidade de um teste sensível, para avaliação de frescor em peixes de água doce.

O corimbatá não apresentou acrêscimos das BT muito evidentes, porém elas acompanharam as mudanças das BV, que neste experimento particular, deram acrêscimos bem maiores que os relatados por KUAYE (1982). Neste peixe, aproximadamente 50% das BT foi feito pelas BV.

O experimento com sardinha inteira (QUADRO 10, FIGURA 12) mostrou que a determinação das BT teria uma utilidade semelhante às BV. Desde o primeiro até o último dia de estocagem, as BT aumentaram em 109% e as BV em 86%. Quando foi estocado filé de sardinha, embalado em saco plástico para evitar a lavagem dos solúveis pelo gelo, as BT aumentaram em 179% contra 99% das BV. Não foi a intenção deste experimento verificar se era mais adequado conservar a sardinha inteira ou como filé. Apenas se pretendeu conservar os compostos solúveis para sua determinação total. A medição das BT parece ser especialmente adequada para peixes pequenos, nos quais a deterioração ocorre mais por hidrólise das proteínas do que por desaminação ou descarboxilação microbiana. Este fato se aprecia claramente na evolução da relação BV/BT, que apresenta valores em torno de 31% no filé de sardinha fresca, descendo para valores em torno de 22% no filé mais velho. Isto é, o aumento das BT é maior que o respectivo das BV.

Uma situação semelhante se observa com a cavalinha (QUADRO 11, FIGURA 13), em que o acréscimo das BT é muito maior que os das BV, seja no peixe inteiro como também nos filês separados. É conhecido o fato que a cavalinha e o bonito, ambos da família Scombroidea se tornam moles com poucos dias de captura.

Tanto na sardinha, como na cavalinha, as BV correspondem aproximadamente a $1/5$ do valor das BT.

Nos dois peixes brancos examinados (QUADRO 12, FIGURA 14), a determinação das BT foi menos demonstrativa da perda do frescor que as BV. As BT aumentaram 115 e 43% em pescada e corvina, enquanto que as BV deram acréscimo de 192 e 164%, respectivamente. O desempenho das BT foi menos ruim com pescada que com corvina, voltando a confirmar que este teste tem melhor performance com peixes suscetíveis de sofrer amolecimento (pescada) antes de apresentar outros sinais da deterioração.

A relação BV/BT aumenta com os dias de armazenagem, acusando um regime de acréscimo mais acelerado nas BV do que nas BT.

V. CONCLUSÕES

1. Os testes de seleção de solventes para extração das bases totais (BT) demonstraram que o etanol absoluto, na relação de 1:3 (peixe:solvente), foi o mais adequado, pois além de extrair, eficientemente, a TMA e as BNV, usadas como monitores, apresentou a menor taxa de material nitrogenado interferente.
2. A inclusão de íons Ca^{++} no etanol diminuiu a quantidade de material nitrogenado acompanhante, sem afetar a extração das bases monitoras.
3. A liberação das substâncias básicas totais do pescado e de N de NH_4Cl adicionado foi mais eficiente com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ que com MgO e ZnO , obtendo-se recuperações acima de 90%.
4. O teor de água no sistema extrator é crítico para se obter resultados reproduzíveis. Entre 20 e 26% de água no etanol, os valores das BT apresentam-se relativamente constantes e os brancos constituem ao redor de 1% do gasto total de HCl da titulação.
5. A extração e liberação simultâneas das BT, pela inclusão do $\text{Ca}(\text{OH})_2$, no próprio recipiente extrator, mostrou resultados quase que semelhantes com o método de extração preliminar e alcalinização posterior. Esta modificação torna a determinação das BT mais simples e rápida que a determinação das BV.

6. A identificação e quantificação das substâncias dos extratos de BT capazes de reagir com ninidrina, fracionadas por troca iônica, demonstrou que os compostos mais importantes são: histidina e amônia e de menor importância a lisina, glicina e alanina. Na sardinha 70,9% do NNP reagiu com ninidrina, sendo que o N da histidina contribuiu sozinho com 47,6% do NNP. A pescada e corvina apresentaram 43,2 e 37,2% de substâncias positivas com ninidrina e o corimbatã 36,2%. O componente principal da pescada e corvina foi a amônia, contribuindo com 32,3 e 25,1%, respectivamente. Aproximadamente 30% de NNP da sardinha e 60% do NNP da corvina, pescada e corimbatã não reage com ninidrina.
7. A determinação das BT em pescada, corvina, tilápia, corimbatã, sardinha e cavalinha, estocadas em gelo durante treze dias, demonstrou que as BT evoluíram mais notoriamente que as BV em sardinha, cavalinha e tilápia. No corimbatã, a evolução das BT e das BV foi quase que semelhante e na pescada e corvina as BT foram menos sensíveis que as BV para acusar deterioração.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMLACHER, E. *Rigor Mortis in Fish*. Em: BORGSTROM, G. Ed. *Fish as Food*, Academic Press, New York, Vol. I p.345-410 (1961).
- ANTONACOPOULOS, N. Reconocimiento Químico-Bromatológico y Calificación del Pescado y sus Productos. Em: LUDORF, W. & MEYER, V. *El Pescado y los Productos de la Pesca*. Trad. de Jaime Esain Escobar 2. Ed. Zaragoza, Editorial Acribia p.201-230, 1973.
- AOAC. *Official Methods of Analysis*, 13. Ed Method nº18026. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 1980.
- ARAI, K. Nucleotides in the Muscle of Marine Invertebrates. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 32(2): 174, 1966.
- ARARAKI, J. & SUYAMA, M. Free and Conjugated Amino Acids in the Extractives of Anchovy. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 32: 74, 1966.
- BALDINI, V.L.S. Biogenic Amines and Deterioration of Fish. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos.* 19(4): 398-402 Campinas, S.P., 1982.
- BORGSTROM, G. Shellfish Protein. Nutritive Aspects. Em: BORGSTROM, G. Ed. *Fish as Food*. Academic Press, New York, vol. II, p.115-148, 1962.

- BOTTA, J.R.; NOONAN, P.B. & LAUDER, J.T. Chemical and Sensory Analysis of Ungutted Offshore (Nonspawning) Capelin (*Mallotus villosus*) Stored in Ice. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 35: 976-980, 1978.
- BRAMSTEDT, F. The Spoilage of Fresh-Water Fish. Em: BORGSTROM, G. Ed. *Fish as Food*. Academic Press New York, Vol. I p.613-638, 1961.
- BURT, J.R. Hypoxantine: A Biochemical Index of Fish Quality. *Process. Biochem.* 12(1): 32-25, 1977.
- CASTRO, L.A.B. Lavagem da Trimetilamina (TMA) pela Água de Fusão do Gelo utilizado na Conservação do Camarão Sete Barbas (*Xiphopeneus kroyeri*). *Boletim do Instituto da Pesca.* 4(2): 29-36, 1975.
- CHIA-PING, S.; NICKELSON II, R. & FINNE, G. Ammonia-Producing Enzymes in White Shrimp Tails. *J. Food Sci.* 43(5): 1400-1404, 1978.
- CIDA/FAO. A Collection of Analytical Methods and Testing Procedures for the Assessment of Fish and Shellfish Quality. Training Course in Fish Handling, Plant Sanitation, Quality Control and Fish Inspection Dakar, Senegal October 10th to November 4th, 55p, 1977.

- COBB III, B.F.; ALANIZ, I. & THOMPSON JR., C.A. Biochemistry and Microbial Studies on Shrimp: Volatile Nitrogen and Amino Nitrogen Analysis. *J. Food Sci.* 38: 431, 1973.
- _____ & VANDERZANT, C. Development of a Chemical Test for Shrimp Quality. *J. Food Sci.* 40: 121-124, 1975.
- CONTRERAS-GUZMÁN, E. *Tecnología de Pescados e Derivados*. Anotações do Curso TA-923, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 60 p. (Mimeog.) Univ. Estadual de Campinas, 1984.
- CUTTING, C.L. Changes in the pH and Buffering Capacity of Fish During Spoilage. *J. Sci. Food Agric.* 4: 597-603, 1953.
- DINGLE, J.R.; HINES, J.A. & FRASER, D.I. Post Mortem Degradation of Adenine Nucleotides in Muscle of the Lobster (*Homarus americanus*). *J. Food Sci.* 33: 100, 1968.
- DIPOA. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Ministério da Agricultura, DIPOA. 364p. Brasília, Brasil, 1974.
- DOKE, S.N.; WARRIER, S.B.K.; NINJOOR, V. & NADKARNI, G.B. Role of Hydrolytic Enzymes in Spoilage of Fish. *J. Food Sci. and Tech.* 16(6): 223, 1979.
- DYER, W.J. Amines in Fish Muscle. 1.- Colorimetric Determination of TMA as the Picrate Salt. *J. Fish Res. Bd. Can.* 6: 351-358, 1945.

ENDO, K. & SIMIDU, W. Studies on Muscle of Aquatic Animals-23.

Distribution of Extractive Nitrogens in Bloody Muscle. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 21: 127, 1955.

HASHIMOTO, K.; WATANABE, S.; KONO, M. & SHIRO, K. Muscle Protein Composition of Sardine and Mackerel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 45: 1435, 1979.

HIBIKI, S. & SIMIDU, W. Studies on Putrefaction of Aquatic Products-27. Inhibition of Histamine Formation in Spoiling of Cooked Fish and Histamine Content in Various Fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 24: 916, 1959.

IKEDA, S. Other Organic Components and Inorganic Components. Em: CONNELL, J.J. ed. *Advances in Fish Science and Technology*. Fishing News Books Ltd. p. 111-123, England, 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. Vol. 1, São Paulo, Brasil, 1976.

ITO, K. Amino Acid Composition of the Muscle Extracts of Aquatic Animals. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 23: 497, 1957.

JACQUOT, R. Organic Constituents of Fish and Other Aquatic Animal Foods. Em: BORGSTROM, G. ed. *Fish as Food*. Academic Press, New York, Vol. I, p.146-192, 1961.

- JONES, N.R. & MURRAY, J. Degradation of Adenine and Hipoxantine Nucleotide in the Muscle of Chill Stored Trawled Cod (*Gadus callarias*). *J. Sci. Fd. Agric.* 13: 763, 1962.
- KASSEMSARN, B.O.; 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*). *J. Food Sci.* 28: 28, 1963.
- KIMATA, M. The Histamine Problem. Em: BORGSTROM, G. Ed. *Fish as Food*. Academic Press, New York, Vol.I 329-352, 1961.
- KRZECZKOWSKY, R.A. Amino Acid, Fatty Acid and Proximate Composition of Snow Crab. *J. Food Sci.* 39(2): 386-388, 1974.
- KUAYE, A.Y. Comparação dos Métodos para Determinação das Bases Nítrogenadas Voláteis [BNV] em Pescado: Parâmetros Críticos e Modificações. Faculd. de Eng. de Alimentos e Agrícola. Univ. Estadual de Campinas. Tese de Mestrado 95p. Campinas, S.P. 1982.
- LAHIRY, N.L.; MOORJANI, M.N. & BALIGE, B.R. Factors Influencing the Keeping Quality of Fresh-Water Fish in Ice. *Food Tech.* 17 (9): 123-125, 1963.
- LAZLO, H. Controle Sanitário do Pescado e Derivados. *Revista Nacional da Pesca.* 17 (147): 18-24, 1975.

LISTON, J. Health and Safety of Seafoods. *Food Tech. in Australia* 32 (9): 428-436, 1980.

_____; STANSBY, M.E. & OLCOTT, H.S. Bacteriological and Chemical Basis for Deteriorative Changes. Em: STANSBY, M.E., Ed. *Industrial Fishery Technology*. Reinhold, New York, p.350-361, 1963.

LUCKTON, A. & OLCOTT, H.S. Content of Free Imidazole Compounds in the Muscle Tissue of Aquatic Animals. *Food Res.* 23: 611, 1958.

LUDORF, W. & MEYER, V. El Pescado como Alimento. Em: LUNDORF, W. & MEYER, V. *El Pescado y los Productos de la Pesca*; tradução de Jaime Esain Escobar. Ed. Acribã, 2. Ed., p.74-100. Zaragoza, Espanha, 1973.

LUPIN, H.M. & TRUCCO, R. Variación en el Contenido de Nitrogenio Volátil (NBV) durante el Proceso de Pescado Salado y Conservas. *Industria Conservera*, 44 (466): 205-207, 1978.

MAIA, E.L. Composição, Conservação e Utilização de Corimbatã (*Prochilodus scrofa*). Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. Tese de Mestrado, 130p. Univ. Estadual de Campinas, Campinas, S.P., 1980.

MENDES, M.H. Evolução das Bases Voláteis Totais e da Trimetilamina em Pescado e o seu Uso como Indicador de Qualidade. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Tese de Mestrado, 63p., 1974.

- MOLTENO, C.; CONTRERAS, G.E.; REPOSSI, J. & ALIAGA, H. *Composición Química del Destilado de Agua de Cola y su Utilización en Calderas*. Instituto de Fomento Pesquero, Publicación nº28, 39p., 1967.
- MORGA, A.A. *Avaliação do Índice de Frescor da Pescada Fogete (Macrodon ancylodon) Conservada em Gelo*. Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola. Univ. Estadual de Campinas. Tese de Mestrado 80p. Campinas, S.P., 1975.
- MURATA, M.; SAKAGUCHI, M. & KAWAI, A. Formation of Trimetilamine and Dimetilamine in Bloody Muscle, Ordinary Muscle and Liver of Yellowtail During Iced Storage. *Bull. Res. Inst. Food Sci.*, Kyoto Univ. 43: 18, 1980.
- MURRAY, C.K. & GIBSON, D.M. An Investigation of the Method of Determining Trimethylamine in Fish Muscle Extracts by the Formation of its Picrate Salt. Part I. *J. Food Tech.* 7: 35-48, 1972.
- NERISSON, P. L'Histamina Comme Indicateur d'Alteration. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 39(4): 471-482, 1976.
- NETO, F.M. *Modificações Químicas, Bioquímicas e Sensoriais do Híbrido de Tilápia estocado em Gelo*. Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Univ. Estadual de Campinas. Tese de Mestrado 79p. Campinas, S.P., 1984.

- PEARSON, D. *Flesh Foods: Table Jellies*. Em: *The Chemical Analysis of Foods.*, 7. Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh p.386-387, 1976.
- REAY, G.A.; CUTTING, C.L. & SHEWAN, J.M. *The Nation's Foods*. Ed. BACHARAT, A.L. & RENDLE, T. Part VI, p.269. London: Society of Chemical Industry.
- RASMUSSEN, E.H. Determination of Freshness of Minced Fish. *Fiskeriministeriets. Forsogslad Rept. n° 87. Konserver* 8(4): 37-42, 1950.
- REPOSSI, J. Estudio Preliminar sobre los Gases Tóxicos Produzidos durante la Descomposición del Pescado en la Industria de Harina. *Instituto de Fomento Pesquero, Publicación n°38, 17p. 1968.*
- RITCHIE, A.H. The Formation of Diamines and Poliamines during Storage of Mackerel (*Scomber scombrus*). Em: CONNELL, J.J. ed. *Advance in Fish Science and Technology*. Fishing News Books Ltd. p.489-494, England, 1980.
- SAINCLIVIER, M. Les Matières Azotées Non Protéiques (NNP). Em: *L'Industrie Alimentaire Halieutique*. Ed. Science Agronomiques p.90-97, Rennes, France, 1983.
- SAKAGUCHI, M.; MURATA, M. & KAWAI, A. Changes in Free Amino Acids and Creatine Contents in Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) Muscle During Ice Storage. *J. Food Sci.* 47: 1662, 1982.

- SIEBERT, G. Enzymes of Marine Fish Muscle and Their Role in Fish Spoilage. Em: HEEN, E. & KREUZER, R. ed. *Fish in Nutrition*. London, Fishing News Books Ltd., p.80-82, 1962.
- SIMIDŮ, W. Non Protein Nitrogenous Compounds. Em: BORGSTROM, G. ed. *Fish as Food*. Academic Press. New York Vol.I, 35-334, 1961.
- SHAW, D.H.; GARE, R.L. & KENNEDY, A.M. Chemical and Sensory Changes During Storage of Witch Flounder (*Glyptocephalus cynoglossus*) in Ice. *J. Food Sci.* 42: 159-161, 1977.
- SHEWAN, J.M. & JONES, R. Chemical Changes occurring in Cod Muscle During Chill Storage and Their Possible Use as Objective Indices of Quality. *J. Sci. Food Agric.* 8: 491-498, 1957.
- _____. The Bacteriology of Fresh and Spoiling Fish and Some Related Chemical Changes. In: HAWTHORN, J. & LEITCH, J.M., ed. *Recent Advances In Food Science*. London, Vol.I, p.167, 1962.
- _____. The Microbiology of Fish and Fishery Products. A Progress Report. *J. Appl. Bact.* 34 (2): 299-351, 1971.
- SOUDAN, F. *La Conservation par le Froid des Poissons, Crustacés et Mollusques*. Ed. J. Baillière et Fils, Paris, 1965.
- _____. Les Matieres Azotees Non Proteiques (NNP). En: SAINCLIVIER, M. *L'Industrie Alimentaire Halieutique*. p.95 Ed. Sciences Agronomiques, Rennes, France, 1983.

SPINELLI, J. Biochemical Basis of Fish Freshness. *Process Biochem.* 6 (5) p.3-6, 1971.

STANSBY, M.E.; HARRISON, R.W.; DASSOW, J. & SATER, M. Determining Volatile Bases in Fish: Comparison of Precision of Certain Methods. *Ind. Eng. Chem.* 16(9): 593-596, 1944.

STONE, F.E. Enzymatic Deamination of Adenosine Monophosphate (AMP), Adenosine and Adenine by Salmon, Crab and Scallop Muscle Extracts. *J. Food Sci.* 35: 565-567, 1970.

_____. Inosine Monophosphate (IMP) and Hypoxanthine Formation in Three Species of Shrimp Held on Ice. *J. Milk Food Tech.* 34(7): 354-356, 1971.

TARR, H.L.A. & COMER, A.G. Deamination of Adenine and Related Compounds and Formation of Deoxyadenosine and Deoxyinosine by Lincoln Muscle Enzymes. *Can. J. Biochem.* 42: 1527, 1964.

_____. Post Mortem Changes in Glycogen, Nucleotides, Sugar Phosphate and Sugars in Fish Muscle. *J. Food Sci.* 31: 846, 1966.

THORTON, R.M. & NEILSON, R.B. Amines I: Preparation and Properties and Amines II: Reactions. THORTON, R.M. & NEILSON, R.B. *Organic Chemistry*. 2. Ed., 1966. p.719-721 and 743-747. Ed. ALLYN & BACON, Inc.; Boston, Mass.

- 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 Tech.* 10(12): 614-617, 1956.
- UCHIYAMA, H. EHIRA, S.; KOBAYASHI, H. & SHIMIZU, W. Significance in Measuring Volatile Bases and Trimethylamine Nitrogen and Nucleotides in Fish Muscle as Indices of Freshness of Fish. *Bull. Japan. Soc. Sci.* 36: 177, 1970.
- VARELA, G. & WOJECIECH, R. Sobre algunos Procesos Bioquímicos en la Descomposición de la Merluza (*Merlucius merlucius*). *Annales Bromatol.* 8: 6-18, 1956.
- WADA, S.; TAKADA, M. & KOIZUMI, C. Quantitative Analysis of Histamine in Marine Food Products by Gas Liquid Chromatography. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 48(11): 1657-6161, 1982.
- WOOD, A.J.; SIGURDSSON, G.J. & DYER, W.J. The Surface Concept in Measurement of Fish Spoilage. *J. Fish Res. Bd. Canada.* 6(1): 53-63, 1942.