



IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO DO ATP (ADENOSINA TRIFOSFATO) EM AMOSTRAS DE PESCADO POR ELETROFORESE CAPILAR DE ALTA EFICIÊNCIA (HPCE)

Lucas Guilherme de **Freitas**¹; Gilvan Machado **Batista**²; Maria Teresa **Bertoldo Pacheco**³;
Márcia Mayumi **Harada Haguiwara**⁴; Vera Sônia **Nunes da Silva**⁵

Nº 15240

RESUMO - Para a comercialização do pescado proveniente da piscicultura em boas condições de higiene é necessário um rigoroso controle de qualidade. O “pré-rigor” e “rigor mortis” são fases importantes para o monitoramento da ação das enzimas e dos microrganismos. Uma das ferramentas para avaliar o estado de frescor do pescado, é o monitoramento dos produtos de degradação do ATP. O objetivo principal deste estudo foi a implementação da metodologia para quantificação dos produtos de degradação do ATP por eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) e comparar à técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As concentrações dos padrões de nucleotídeos (ATP, IMP, ADP, AMP, HX e HxR) necessárias para compor a curva analítica para HPCE foram até 80 vezes maiores que as utilizadas para o HPLC. No estudo foram utilizadas amostras de pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822) e carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia híbrida que permaneceram armazenadas pelo período de 2 (CMS-2) e 5 meses (CMS-5). Os nucleotídeos quantificados por HPCE e HPLC mantiveram-se no mesmo patamar para as amostras de pirarucu *Arapaima gigas*. Os resultados das análises efetuadas por HPCE apresentaram teores $6,42 \pm 0,24 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de HX e $8,64 \pm 0,61 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de IMP para a CMS-2, e para a CMS-5 foi encontrado $8,05 \pm 0,21 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de HX. Apesar da técnica de HPCE ser menos sensível em relação a HPLC, apresentou vantagem como baixo consumo de reagentes. O HPCE provou ser uma ferramenta importante para monitorar a qualidade do pescado e CMS.

Palavras-chave: HPCE, nucleotídeos, pescado, estado de frescor.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia Alimentos, FAJ, Jaguariúna-SP; l.g.freitas@hotmail.com
2 Colaborador, doutorando: Universidade Nilton Lins, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus-AM
3 Colaborador, Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas – SP
4 Colaborador, Pesquisador, CTC/ITAL, Campinas – SP
5 Orientador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP, vera.silva@ital.sp.gov.br



ABSTRACT - For the marketing of fish a rigorous quality control is needed. The "pre-rigor" and "rigor mortis" are important steps for monitoring the action of enzymes and microorganisms. One of the tools to assess the state of freshness of the fish, is the monitoring of ATP degradation products. The aim of this study was the implementation of the methodology for quantification of ATP breakdown products via high performance capillary electrophoresis (HPCE) and comparing the high performance liquid chromatography (HPLC). The concentrations of the nucleotides standards (ATP, IMP, ADP, AMP, HX and HxR) required to compose the analytical curve for HPCE were up to 80 times higher than those used for HPLC. In the study it was pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822) and mechanically separated meat (MSM) hybrid tilapia were used which remained stored for periods of 2 (MSM-2) and 5 months (MSM-5), respectively. Nucleotides quantified by HPLC and HPCE remained at the same level for samples of "pirarucu" *Arapaima gigas*. The results of the analysis carried out by HPCE showed HX content of $6.42 \pm 0.24 \mu\text{mol.g}^{-1}$ and IMP of $8.64 \pm 0,61 \mu\text{mol.g}^{-1}$ for MSM-2, for MSM-5 was found $8.05 \pm 0,21 \mu\text{mol.g}^{-1}$ of HX. Despite the HPCE is less sensitive than HPLC, showed advantage as a low consumption of reagent. The HPCE proved to be an important tool to monitor the quality of fish and MSM.

Key-words: HPCE, nucleotides, fish.

1 INTRODUÇÃO

A pesca por definição é o ato de extração de organismos vivos tanto em águas continentais, como marítimas. O Brasil dispõe de um potencial a pesca atrativo, pois apresenta uma vasta bacia hidrográfica e uma ótima ictiofauna (BRASIL, 2010), o que reflete o forte crescimento dessa atividade e evidencia que a pesca é um mercado em ascensão e promissor, e em contrapartida estimula novos investimentos na aquicultura.

Por outro lado, a conscientização da população por alimentos mais completos e saudáveis favoreceu o aumento do consumo e, desta forma, o pescado atende de forma positiva a necessidade dos consumidores por apresentar uma carne altamente nutritiva e de variedade sensorial bastante ampla considerando a diversidade das espécies (GEROMEL & FORSTER, 1989). Apesar das vantagens oferecidas, o pescado é um dos produtos de origem animal que mais rápido se deteriora, reduzindo assim o tempo de seu consumo. Porém, algumas técnicas podem estender o período de armazenamento tais como, o controle adequado do pré- e pós-rigor, a diminuição das injúrias sofridas pelos peixes, os métodos de abate adequados e resfriamento pós-abate, favorecendo um maior período de *shelf life* (FERREIRA, 1987).



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

A alta perecibilidade do pescado está associada a rápida rigidez pós morte, elevadas contagens microbianas, altas concentrações de água e nutrientes nos tecidos que servem de substrato a microrganismos. A fase de rigidez ocorre alguns minutos após a morte do pescado, e se caracteriza por causar uma ligeira redução no pH devido ao processo bioquímico de produção de ácido lático e a utilização do glicogênio como fonte de energia (BERAQUET & LINDO, 1985; HUSS, 1999; BARROS, 2002).

O glicogênio é a fonte de reserva energética do músculo, sendo que a excessiva movimentação do peixe diminuirá consideravelmente essa reserva, deixando assim o pescado vulnerável ao ataque bacteriano. Adicionalmente na fase *rigor-mortis*, as bactérias se instalam devido a diminuição do ácido lático e aumento do pH. A monitorização e controle do *rigor-mortis* proporcionarão produtos *in natura* de melhor qualidade (FERREIRA, 1987).

Várias técnicas são empregadas para avaliar a qualidade do pescado, tais como: análises sensoriais, microbiológicas e teores de lipídios, porém, são técnicas ineficientes e relativamente demoradas. Para tanto, o avanço da ciência na área de instrumentação analítica tem desenvolvido novas metodologias, por meio de técnicas de cromatografia líquida (HPLC), cromatografia gasosa (GC) e, por fim, na década de 80 a técnica de HPCE começou a ser reconhecida após a publicação de um artigo no Journal of Analytical Chemistry, pelos cientistas Jorgenson e Lukacs (1981). Portanto, esta técnica foi alvo de estudo neste trabalho, que teve como objetivo principal a implementação da metodologia para quantificação dos produtos de degradação do ATP em pescado e em carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia híbrida. Nas amostras de pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822), foi efetuada também a quantificação dos nucleotídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para efeito de comparação à técnica de HPCE. Para tanto, no estudo foram utilizadas amostras de pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822), endêmica da Bacia Amazônica (PEREIRA-FILHO; ROUBACH, 2005), cuja espécie foi descoberta pelo médico suíço e professor da história natural, Heinrich Rudolf Schinz (levando, portanto, a denominação do seu sobrenome), classificada na ordem Osteoglossiformes e família Arapaimidae, as amostras foram cedidas pelo colaborador deste estudo Batista², assim como a carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia híbrida procedente do estudo do colaborador Hagiwara⁴.

1.1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1.1 Matérias Prima:

- O pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822) procedente da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirau-AM. As carnes mecanicamente separadas (CMS) de tilápia híbrida

foram produzidas a partir de carcaças de tilápias fornecidas pelo frigorífico Royal Fish localizado na cidade de Sumaré-SP e de tilápias provenientes do cultivo da cidade de Santa Fé do Sul-SP.

- Soluções padrões de Nucleotídeos (**IMP**: Inosina monofosfato; **ATP**: Adenosina trifosfato; **ADP**: Adenosina difosfato; **AMP**: Adenosina monofosfato; **HX**: Hipoxantina e **HxR**: Inosina), (marca: Sigma-Aldrich).

1.2 Métodos

1.2.1 Extração dos nucleotídeos nas amostras de pirarucu e da CMS de tilápia.

A extração dos nucleotídeos (Figura 1) foi efetuada de acordo com Ozogul *et al.*, (2000). Deste modo, para verificar a degradação do ATP a extração dos nucleotídeos no pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822) foi efetuada no momento da captura e após 3 dias de armazenamento em gelo. As carnes mecanicamente separadas (CMS) de tilápia foram armazenadas por 2 meses (CMS-2) e por 5 meses (CMS-5); a temperatura de -30°C em congelador de placas por 5 horas e posteriormente mantidas a -18°C , para a extração dos nucleotídeos.

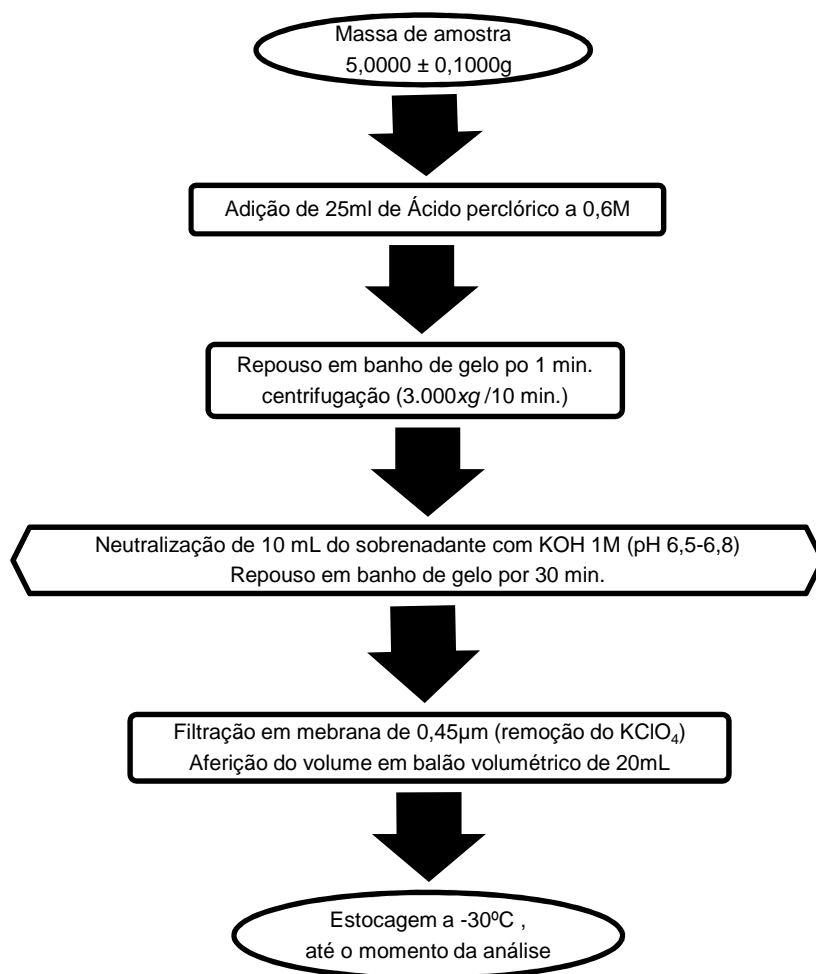


Figura 1. Fluxograma simplificado da extração dos nucleotídeos do pirarucu e da CMS de tilápia.



1.2.2 Preparação da curva padrão para HPCE e HPLC.

Foi elaborada uma curva padrão composta por 5 pontos, com concentrações que variaram num range de 0,010312 a 0,191316 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ para HPCE e de 0,0001244 a 0,0066043 $\mu\text{moles.g}^{-1}$ para HPLC. Estes foram filtrados em membrana de 0,45 μm e 600 μL foram transferidos para os frascos específicos para eletroforese e capilar e de cromatografia. Assim obteve-se uma curva de calibração para cada nucleotídeo, baseada na equação da reta ($y = ax + b$).

1.2.3 Estabelecimentos das condições analíticas para HPCE e HPLC.

As condições analíticas para o HPCE: Equipamento (marca: Agilent, EUA); eletrólito: tampão borato 20mM, pH 9,3; capilar de sílica fundida 40,0cm; 50 μm di; Injeção: 10s; 25mBar; Voltagem: 25 kV; detector de arranjo de diodos; λ :200nm; 15 min de corrida. As condições analíticas para o HPLC: Equipamento (marca: Shimatzu, Japão); fase móvel A: tampão fosfato 0,1M; pH 7,0; em gradiente (Tabela 1) com a acetonitrila (fase móvel: B); volume injetado: 20 μL ; Vazão: 1mL.min⁻¹; coluna KINETEX - C18 (250cmX4,6 mm); detector de arranjo de diodos; λ :254nm;15 min de corrida.

Tabela 1. Gradiente utilizado para a quantificação dos nucleotídeos por HPLC.

TEMPO (min.)	GRADIENTE (%)	
	Fase móvel A	Fase móvel B
0,00	100	0
5,00	95	5
10,00	70	30
12,00	100	0
15,00	100	stop

1.2.4 Análise estatística: Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (PIMENTEL GOMES, 2009), para determinação da diferença significativa entre as médias (nível de significância de $p \leq 0,05$), utilizando o programa SAS – *Statistical Analysis System* (SAS, Cary, USA, 1983).

1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Resultados comparativos entre a eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para as amostras de pirarucu.

Os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3, são referentes a concentração dos nucleotídeos provenientes da degradação do ATP do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822), no



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

momento da captura (T = zero) e armazenados a 20°C por 3 dias (T = 3). No tempo zero somente o ADP e HX apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas HPCE e HPLC. Após o período de 3 dias as técnicas analíticas apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) para os nucleotídeos ADP, HxR e HX.

Nas duas técnicas analíticas a concentração de IMP para o pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822) permaneceu elevada tanto no tempo ZERO como no terceiro dia de armazenamento, uma vez que a passagem do ATP a IMP é muito rápida (HUSS, 1999 e OGAWA & MAIA, 1999). Este teor sugere que o IMP provavelmente exerce impacto direto sobre o sabor característico do pescado fresco, e confirma que a degradação do ATP foi muito lenta, e que o valor de IMP pode estar associado também ao armazenamento adequado do pescado.

Tabela 2. Resultados dos produtos de degradação do ATP do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822), no momento da captura (T = zero) e quantificados por HPCE e HPLC.

PARÂMETROS	NUCLEOTÍDEOS ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)***				
	IMP	ADP	HxR	AMP	HX
Amostra (T = Zero) HPCE*	5,78(0,33) ^a	0,21(0,02) ^a	0,42(0,05) ^a	0,79(0,02) ^a	0,08(0,01) ^a
Amostra (T = Zero) HPLC**	5,95(0,13) ^a	0,15(0,01) ^b	0,43(0,06) ^a	0,69(0,02) ^a	0,04(0,01) ^b

Resultados dos nucleotídeos (**IMP**: Inosina monofosfato; **ATP**: Adenosina trifosfato; **ADP**: Adenosina difosfato; **AMP**: Adenosina monofosfato; **HX**: Hipoxantina e **HxR**: Inosina). *Condições HPCE: Equipamento (marca: Agilent, EUA); eletrólito: tampão borato 20mM, pH 9,3; capilar de sílica fundida 40,0cm; 50 μm di; Injeção: 10s; 25mBar; Voltagem: 25 kV; detector de arranjo de diodos; λ :200nm; 15 min de corrida. **Condições HPLC: Equipamento (marca: Shimatzu, Japão); fase móvel A: tampão fosfato 0,1M; pH 7,0; em gradiente com a acetonitrila (fase móvel: B); volume injetado: 20 μL ; Vazão: 1mL.min⁻¹; coluna KINETEX - C18 (250cmX4,6 mm); detector de arranjo de diodos; λ :254nm; 15 min de corrida. ***Resultados expressos como média \pm desvio padrão das análises em triplicata. Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 3. Resultados dos produtos de degradação do ATP do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz (1822), armazenados a -20°C por 3 dias (T = 3) e quantificados por HPCE e HPLC.

PARÂMETROS	NUCLEOTÍDEOS ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)***				
	IMP	ADP	HxR	AMP	HX
Amostra (T = 3 dias) HPCE*	8,64(0,61) ^a	0,22(0,00) ^a	1,57(0,16) ^b	0,15(0,01) ^a	0,03(0,01) ^a
Amostra (T = 3 dias) HPLC**	8,35(0,57) ^a	0,16(0,01) ^b	2,10(0,25) ^a	0,17(0,01) ^a	0,01(0,00) ^b

Resultados dos nucleotídeos (**IMP**: Inosina monofosfato; **ATP**: Adenosina trifosfato; **ADP**: Adenosina difosfato; **AMP**: Adenosina monofosfato; **HX**: Hipoxantina e **HxR**: Inosina). *Condições HPCE: Equipamento (marca: Agilent, EUA); eletrólito: tampão borato 20mM, pH 9,3; capilar de sílica fundida 40,0cm; 50 μm di; Injeção: 10s; 25mBar; Voltagem: 25 kV; detector de arranjo de diodos; λ :200nm; 15 min de corrida. **Condições HPLC: Equipamento (marca: Shimatzu, Japão); fase móvel A: tampão fosfato 0,1M; pH 7,0; em gradiente com a acetonitrila (fase móvel: B); volume injetado: 20 μL ; Vazão: 1mL.min⁻¹; coluna KINETEX - C18 (250cmX4,6 mm); detector de arranjo de diodos; λ :254nm; 15 min de corrida. ***Resultados expressos como média \pm desvio padrão das análises em triplicata. Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os níveis de hipoxantina foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), independente do tempo e da técnica utilizada permaneceram baixos confirmando o frescor dos pescados. Os



valores encontrados pelas técnicas de HPCE e HPLC no tempo zero foram satisfatórios para todos os nucleotídeos, demonstrando que as técnicas são adequadas. Além disso, possivelmente o período de três dias foi muito curto para apresentar uma degradação acentuada dos nucleotídeos.

1.3.2 Resultados dos nucleotídeos nas amostras da carne mecanicamente separada (CMS) de tilápia híbrida pela técnica de eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE).

Na Tabela 4 a CMS-2 apresentou níveis de hipoxantina de $6,42 \pm 0,24 \mu\text{mol.g}^{-1}$, sendo este composto considerado o responsável pelo sabor amargo conferido ao pescado durante o processo de degradação, em contrapartida o teor de IMP foi de $8,64 \pm 0,61 \mu\text{mol.g}^{-1}$, sendo este um indicativo de que o produto ainda apresentava características adequadas para o consumo e a garantia de que o sabor característico do peixe ainda prevalecia.

Tabela 4. Resultados dos produtos de degradação da carne mecanicamente separada de tilápia híbrida, armazenadas a -18°C por 2 meses (CMS-2) e 5 meses (CMS-5), quantificados por HPCE.

PARÂMETROS	NUCLEOTÍDEOS ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)*				
	IMP	ADP	HxR	AMP	HX
CMS-2	8,64(0,61)	ND**	ND**	ND**	6,42(0,24) ^b
CMS-5	ND**	ND**	ND**	ND**	8,05(0,21) ^a

Resultados dos nucleotídeos (**IMP**: Inosina monofosfato; **ATP**: Adenosina trifosfato; **ADP**: Adenosina difosfato; **AMP**: Adenosina monofosfato; **HX**: Hipoxantina e **HxR**: Inosina). Condições HPCE: Equipamento (marca: Agilent, EUA); eletrólito: tampão borato 20mM, pH 9,3; capilar de sílica fundida 40,0cm; 50 μm di; Injeção: 10s; 25mBar; Voltagem: 25 kV; detector de arranjo de diodos; λ :200nm; 15 min de corrida. *Resultados expressos como média \pm desvio padrão das análises em triplicata. Médias seguidas por uma mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). **ND: Não Detectado.

Já na CMS-5 (Tabela 4) não foi encontrado o IMP, porém o teor de Hx foi de $8,05 \pm 0,21 \mu\text{mol.g}^{-1}$, superior estatisticamente ($p < 0,05$) a CMS-2. Este valor sugere que o produto possa estar em fase de deterioração avançada, pois segundo Gram e Huss (1996) o aumento da Hx pode estar associado não somente à decomposição dos nucleotídeos, mas também à proliferação bacteriana. É importante enfatizar que ao abrir a embalagem no momento da análise foi perceptível o odor desagradável proveniente da CMS-5. Além disso, a HX é a responsável pelo sabor amargo conferido ao peixe durante a estocagem e, está diretamente relacionada a baixa qualidade do pescado (HUSS, 1999; OGAWA & MAIA, 1999). O controle do “*pré-rigor*” e “*rigor mortis*” são fases importantes para o monitoramento de ação das enzimas e dos microrganismos. Para garantir a qualidade e frescor do pescado devem ser tomados todos os cuidados que envolvem toda a cadeia produtiva da pesca, considerando a temperatura durante o armazenamento, processamento, transporte, estocagem e comercialização.



1.4 CONCLUSÃO

O HPCE demonstrou ser uma técnica fácil para avaliar o estado do frescor de pescados e de seus produtos industrializados, como a CMS, além da vantagem em consumir pequenos volumes de reagentes. Por outro lado, a técnica de HPLC mostrou-se mais sensível por permitir trabalhar com concentrações de padrões inferiores as utilizadas em HPCE. Ambas as técnicas podem ser utilizadas com segurança para o monitoramento dos produtos de degradação do ATP.

2. AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, G.C.; MENDES, E.S.; SANTOS, F.L. **Patologia dos peixes**. Revista CFMV, ano 8, n.26, p.44-56, maio, 2002.

BERAQUET, N.J.; LINDO, M.M.K. **Transformações bioquímicas “post mortem” em pescado**. São Paulo: Boletim ITAL, 1985.v.22, p. 169-192

BRASIL. Ministério do Turismo. **Turismo de Pesca: orientações básicas**. / Ministério do Turismo, Secretaria Nacional de Políticas de Turismo, Departamento de Estruturação, Articulação e Ordenamento Turístico, Coordenação Geral de Segmentação. – 2.ed. – Brasília: Ministério do Turismo, 2010. 58 p.

FERREIRA, S.O. **Aplicação de tecnologia a espécies de pescado de água doce visando atender a agroindústria rural**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba. 1987. 122p.

GEROMEL, E.J.; FORSTER, R.J. **Princípios fundamentais em tecnologia de pescado**. São Paulo, 1989.127p.

GRAM, L.; HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 121-137, 1996.

HUSS, H.H. **El pescado fresco; Su calidad y câmbios de su calidad**. Dinamarca: FAO, 1999.

JORGENSON, J.W.; LUKACS, K. D. Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries. **Analytical Chemistry**, 53(8), p. 1298-1302, 1981.

OGAWA, M.; MAIA, E. Manual de Pesca – **Ciência e Tecnologia de Pescados**. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 430p.

PEREIRA-FILHO, M., ROUBACH, R. Pirarucu, *Arapaima gigas*. In: B. BALDISSEROTTO, L. C. GOMES. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005.p. 37-66.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 15ªed. Piracicaba: FEALQ.

ÖZOGUL, F.; TAYLOR K. D.A.; QUANTICK, P.C.; ÖZOGUL. Y. A rapid HPLC-determination of ATP-related compounds and its application to herring stored under modified atmosphere. **International Journal of Food Science & Technology**, v.35, p. 549–554, 2000.

SAS INSTITUTE INC. **SAS Use's Guide**. Cary: SAS Institute Inc, 1028p., 1983.