



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AMINAS BIOGÊNICAS, AMINAS VOLÁTEIS,  
TRIPTOFANO LIVRE E URÉIA COMO ÍNDICES QUÍMICOS DE  
QUALIDADE E FRESCOR DO PESCADO**

**Judite Lapa-Guimarães**

Bióloga

Mestre em Tecnologia de Alimentos

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício**

**Co-Orientadora: Dra. Jana Pickova**

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

**Campinas**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

L31a Lapa-Guimarães, Judite  
Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e uréia  
como índices químicos de qualidade e frescor do pescado /  
Judite Lapa-Guimarães. – Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Pedro Eduardo de Felício  
Co-orientador: Jana Pickova  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Pescados. 2. Qualidade. 3. Cromatografia em camada  
fina. 4. Cefalópodes. 5. Trimetilamina. I. Felício, Pedro  
Eduardo de. II. Pickova, Jana. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em inglês: biogenic amines, volatile amines, free tryptophan and urea as chemical  
indices for quality and freshness evaluation of fish and shellfish

Palavras-chave em inglês (Keywords): Fish, Quality, Thin Layer  
Chromatography,

Cephalopods, Trimethylamine

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Pedro Eduardo de Felício

Elisabete Maria Macedo Viegas

Emílio Segundo Contreras Guzmán

Felix Guillermo Reyes Reyes

Helena Teixeira de Godoy

Marília Oetterer

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício**  
(Orientador)

---

**Profa. Dra. Elisabete Maria Macedo Viegas**

---

**Prof. Dr. Emílio Contreras Guzmán**

---

**Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes Reyes**

---

**Profa. Dra. Helena Teixeira de Godoy**

---

**Profa. Dra. Marília Oetterer**





## AGRADECIMENTOS / ACKNOWLEDGEMENTS

**Prof. Pedro**, pela confiança em meu trabalho e decisões, por transmitir ânimo em todas as ocasiões, por ter me apoiado e defendido com convicção minhas viagens à Suécia para a realização deste estudo, e por ser um padrão de qualidade a ser seguido por quem quiser ser um bom professor.

**Dr Jana Pickova**, dear **Jana**, for welcoming me at the Meat Science Division - SLU and for all support you gave me, for sharing your knowledge and enthusiasm about Fish Science, for making me face challenges and encourage me, for advising me to take life and work easy, for being a unique and admirable person.

**Prof. Contreras**, pelas contínuas palavras de incentivo, por ser o responsável por eu não ter medo de mudar concentrações, trocar solventes, testar e testar; e por ter me ensinado a ser crítica com os resultados.

**Profa. Elisabete M. Macedo Viegas, Bete**, por mais uma vez ter participado e contribuído ativamente em uma tese minha: corrigindo, sugerindo, me tranquilizando, torcendo ...

**Profa. Dra. Marília Oetterer, Profa. Dra. Helena T. de Godoy e Prof. Dr. Felix G. Reyes Reyes**, por terem contribuído para o aperfeiçoamento desta tese e pela compreensão com meus prazos esgotados.

**Dr Kerstin Lundström**, for giving me the possibility to work at the Food Science Department - SLU.

**Reitoria da UNICAMP, Diretoria da FEA, Chefia do DTA, e professores do DTA, Marise A. R. Pollonio, Marcelo Cristianini, Bento da Costa Carvalho Jr, José de Assis Faria, Walkíria Hanada Viotto, Lireny Guaraldo Gonçalves e Arnaldo Yoshiteru Kuaye**, por terem me apoiado na realização deste trabalho.

**Pesquisadores Prof. Paulo Vaz Pires e Pedro Seixas**, do Instituto de Ciência Biomédicas Abel Salazar, cidade do Porto, por terem concordado com a proposta de um trabalho em colaboração e por terem coletado as amostras de lula e sépia em Portugal e as enviado para a Suécia.

**Amigos e colegas do DTA**, por todo companheirismo, palavras de incentivo, por terem sempre torcido por mim. Especialmente: **José Roberto** por ser um amigo com o qual sempre se pode contar; **Marlene**, pela admirável eficiência, por ter sempre todas as informações, por tornar a vida de todos no DTA mais simples, querida **Ana**, por ter sempre um sorriso, por estar sempre onde for preciso; querida amiga **Bete**, por tantas mensagens trocadas, por ter feito eu me sentir próxima quando estava distante, por compartilhar sentimentos, "um beijinho em seu coração"; **Rosana**, por se lembrar de uma "companheira" distante.

**Friends and colleagues at division of Meat Science**, for the amazing time I spent there. You will be in my mind forever. Especially: **Sabine**, for having never given up invite me for coffee and spiking cakes and for sharing the feeling about Natt och Dag; **Sofia** for being so kind and for being always there to help me with fish roe samples, gas tubes, orders; **Gertrud** for bringing valuable information about weather, places to go and where to find any kind of stuffs. Tack snälla!

**Christina**, for being always willing to help, for, in some way, having taken care of me. You show me how comfortable is to be a student who can count on a skilled technician. Thank you for introducing me to the Swedish flowers and for being my friend.

**Patricia**, por sua amizade, por valiosos conselhos nos primeiros meses de trabalho, por receber-me em sua casa, por boas gargalhadas. Muchas gracias.

**M. Eugênia**, por ter compartilhado comigo momentos de tristeza e alegria nestes últimos anos.

**Marco Antonio**, por ter cuidado de tantas coisas para nós, por me mandar notícias hilariantes do Timóteo, por se interessar pelas a"minas".

**Lourdes**, por ter cuidado dos meus peixes melhor do que eu mesma poderia.

**OBRIGADA!**

*Fernando,*

*Obrigada por estar comigo quando vimos uma beleza que nunca tínhamos visto antes.*

*Obrigada por estar comigo quando percebemos que a beleza pode se revelar naquilo  
que sempre esteve ao nosso lado.*



## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
RESUMO GERAL .....	1
GENERAL SUMMARY.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
OBJETIVOS.....	6
<b>CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
1.1. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE E FRESCOR DO PESCADO.....	7
1.2. AMINAS BIOGÊNICAS.....	9
1.2.1. Definição e processos de formação de aminos biogênicas em alimentos .....	9
1.2.2. Aspectos fisiológicos e toxicológicos.....	12
1.2.3. Aminos biogênicas como índices de frescor.....	16
1.2.4. Cromatografia de camada delgada na determinação de aminos biogênicas ..	17
1.3. OUTROS ÍNDICES QUÍMICOS DE FRESCOR PARA O PESCADO .....	19
1.3.1. Bases nitrogenadas voláteis.....	19
1.3.2. Trimetilamina .....	21
1.3.3. Uréia .....	22
1.3.4. Triptofano.....	22
1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
<b>CAPÍTULO 2. SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA .....</b>	<b>29</b>
RESUMO .....	29
SUMMARY .....	30
2.1. INTRODUÇÃO.....	31
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
2.2.1. Reagentes .....	34
2.2.2. Equipamentos.....	34
2.2.3. Amostras para testes.....	34
2.2.4. Desenvolvimento de novos sistemas de solventes para separação das aminos biogênicas por CCD.....	35
2.2.4.1. Dansilação das aminos biogênicas .....	35

2.2.4.2. Efeito de diferentes sistemas de solventes na separação das aminas biogênicas por CCD.....	36
2.2.4.3. Efeito do tempo e temperatura de dansilação .....	37
2.2.4.4. Validação da metodologia - Ensaios de linearidade, precisão e acurácia....	38
2.2.5. Análise estatística.....	39
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
2.3.1. Efeito dos diferentes sistemas de solventes na separação de aminas biogênicas por CCD.....	40
2.3.2. Efeito do tempo e temperatura de dansilação .....	45
2.3.3. Ensaios de linearidade, precisão e acurácia .....	47
2.4. CONCLUSÕES.....	53
2.5. REFERÊNCIAS .....	54

### **CAPÍTULO 3. TEORES DE AMINAS BIOGÊNICAS, BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS, TRIMETILAMINA E URÉIA EM BACALHAU (*Gadus morhua*) E HADOQUE (*Melanogrammus aeglefinus*) ARMAZENADOS EM GELO.....**

RESUMO .....	57
SUMMARY .....	58
3.1. INTRODUÇÃO.....	59
3.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	62
3.2.1. Espécies, condições de armazenamento e amostragem .....	62
3.2.2. Reagentes e equipamentos .....	63
3.2.3. Análises químicas.....	64
3.2.3.1. Preparo das amostras para análise .....	64
3.2.3.2. Determinação de aminas biogênicas.....	64
3.2.3.3. Determinação de bases nitrogenadas voláteis (BNV) .....	65
3.2.3.4. Determinação de trimetilamina (TMA) .....	65
3.2.3.5. Determinação de óxido de trimetilamina (O-TMA).....	66
3.2.3.6. Determinação de uréia .....	66
3.2.3.7. Determinação de nitrogênio não protéico (NNP) .....	66
3.2.4. Análise estatística.....	66
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67
3.3.1. Nitrogênio não protéico.....	67
3.3.2. Aminas biogênicas.....	67
3.3.3. Bases nitrogenadas voláteis (BNV), trimetilamina (TMA) e óxido de trimetilamina (O-TMA) .....	74
3.3.4. Uréia .....	80

3.4. CONCLUSÕES.....	81
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	82
<b>CAPÍTULO 4. TEORES DE AMINAS BIOGÊNICAS, BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS, TRIMETILAMINA, URÉIA E TRIPTOFANO LIVRE EM CEFALÓPODES (<i>Sepia officinalis</i> E <i>Illex coindetii</i>) DURANTE O ARMAZENAMENTO EM GELO.....</b>	<b>85</b>
RESUMO .....	85
SUMMARY .....	86
4.1. INTRODUÇÃO.....	87
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	90
4.2.1. Espécies, condições de armazenamento e amostragem .....	90
4.2.2. Reagentes e equipamentos.....	91
4.2.3. Análises químicas.....	92
4.2.3.1. Preparo das amostras .....	92
4.2.3.2. Determinação de nitrogênio não protéico (NNP).....	92
4.2.3.3. Determinação de aminos biogênicos.....	92
4.2.3.4. Determinação de bases nitrogenadas voláteis (BNV) .....	93
4.2.3.5. Determinação de trimetilamina (TMA) .....	94
4.2.3.6. Determinação de triptofano Livre.....	94
4.2.3.7. Determinação de uréia .....	94
4.2.4. Expressão dos teores de aminos biogênicos, BNV, TMA, triptofano livre e uréia como % do NNP .....	94
4.2.5. Análise estatística.....	95
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	96
4.3.1. Nitrogênio não protéico (NNP).....	96
4.3.2. Aminos biogênicos.....	97
4.3.3. Bases nitrogenadas voláteis (BNV) e trimetilamina (TMA).....	100
4.3.4. Triptofano livre e uréia .....	104
4.4. CONCLUSÕES.....	109
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>115</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 2.1.	Sistemas de solventes avaliados quanto à eficiência na separação de aminas biogênicas.....	37
Tabela 2.2.	Valores de $R_F$ para aminas e amônia após separação por desenvolvimento simples em CCD usando sistemas de solventes diferentes.....	40
Tabela 2.3.	Linearidade da resposta do detector a 330nm e limites de detecção das aminas dansiladas.....	49
Tabela 2.4.	Repetibilidade do método para determinação de aminas biogênicas por CCD, incluindo as etapas de dansilação e cromatografia e somente a etapa de cromatografia.....	50

### CAPÍTULO 3

Tabela 3.1.	Teores de aminas biogênicas em <i>Gadus morhua</i> durante o armazenamento em gelo.....	71
Tabela 3.2.	Teores de aminas biogênicas em <i>Melanogrammus Aeglefinus</i> durante o armazenamento em gelo.....	72

### CAPÍTULO 4

Tabela 4.1.	Intervalos de concentração de aminas biogênicas em lula ( <i>Illex coindetii</i> ) durante o armazenamento em gelo.....	97
Tabela 4.2.	Intervalos de concentração de aminas biogênicas em sépia ( <i>Sepia officinalis</i> ) durante o armazenamento em gelo.....	98



# ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1

Figura 1.1.	Relação entre as fases do frescor, alteração da qualidade sensorial e produção de compostos indesejáveis em pescados e derivados .....	8
Figura 1.2.	Vias metabólicas de formação de aminas biogênicas .....	11

## CAPÍTULO 2

Figura 2.1.	Cromatogramas das aminas e amônia dansiladas após separação por CCD usando a técnica de desenvolvimento simples.....	41
Figura 2.2.	Cromatogramas das aminas e amônia dansiladas após separação por CCD usando a técnica de desenvolvimento duplo.....	44
Figura 2.3.	Efeito do tempo e temperatura de dansilação sobre a área dos picos das aminas dansiladas.....	46
Figura 2.4.	Curvas padrão de putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD), espermina (SPM), histamina (HIS), tiramina (TIR), feniletilamina (PHE), triptamina (TRY) e agmatina (AGM).....	48
Figura 2.5.	Recuperação de padrões de aminas adicionados em bacalhau ( <i>Gadus morhua</i> ) e lula ( <i>Illex argentinus</i> ).....	51

## CAPÍTULO 3

Figura 3.1.	<i>Gadus morhua</i> e <i>Melanogrammus aeglefinus</i> .....	63
Figura 3.2.	Perfis cromatográficos de bacalhau ( <i>G. morhua</i> ) no 25º dia de armazenamento e de hadoque ( <i>M. aeglefinus</i> ) no 19º dia de armazenamento.....	68
Figura 3.3.	QI em <i>Gadus morhua</i> e <i>Melanogrammus aeglefinus</i> durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C).....	74
Figura 3.4.	Teores de BNV, TMA e O-TMA em músculo de <i>Gadus morhua</i> durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C).....	76
Figura 3.5.	Teores de BNV, TMA e O-TMA em músculo de <i>Melanogrammus aeglefinus</i> durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C).....	77
Figura 3.6.	Teores de uréia em bacalhau ( <i>G. morhua</i> ) e hadoque ( <i>M. aeglefinus</i> ) durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C).....	80

## CAPÍTULO 4

Figura 4.1.	<i>Illex sp</i> e <i>Sepia officinalis</i> .....	90
Figura 4.2.	Intervalos de peso de lulas ( <i>Illex coindetii</i> ) e sépias ( <i>Sepia officinalis</i> ).....	91

Figura 4.3.	Testes realizados para comparação de médias dos diferentes períodos de armazenamento.....	95
Figura 4.4.	Teores de nitrogênio não protéico (NNP) durante o armazenamento de lula ( <i>Illex coindetii</i> ) e sépia ( <i>Sepia officinalis</i> ).....	96
Figura 4.5.	Teores de agmatina, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula ( <i>Illex coindetii</i> ).....	98
Figura 4.6.	Teores bases nitrogenadas voláteis (BNV), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula ( <i>Illex coindetii</i> ).....	101
Figura 4.7.	Teores de bases nitrogenadas voláteis (BNV), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia ( <i>Sepia officinalis</i> ).....	101
Figura 4.8.	Teores de trimetilamina (TMA), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula ( <i>Illex coindetii</i> ).....	103
Figura 4.9.	Teores de trimetilamina (TMA), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia ( <i>Sepia officinalis</i> ).....	103
Figura 4.10.	Teores de triptofano livre, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula ( <i>Illex coindetii</i> ).....	105
Figura 4.11.	Teores de triptofano livre, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia ( <i>Sepia officinalis</i> ).....	105
Figura 4.12.	Teores de uréia, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula ( <i>Illex coindetii</i> ).....	107
Figura 4.13.	Teores de uréia, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia ( <i>Sepia officinalis</i> ).....	107

## RESUMO GERAL

Em função da alta perecibilidade do pescado, a avaliação do frescor e qualidade deste alimento deve ser precisa e baseada em métodos consolidados. Bases nitrogenadas voláteis (BNV), trimetilamina (TMA), aminas biogênicas, nucleotídeos, uréia e triptofano livre têm sido propostos como índices de frescor para pescado e podem ser efetivos ou não dependendo da espécie de pescado, microbiota contaminante e condições de armazenamento. A quantificação dos teores de aminas biogênicas é também importante devido ao seu potencial tóxico. Os objetivos deste estudo foram avaliar a utilidade das aminas biogênicas, BNV, TMA, triptofano livre e uréia como índices de qualidade e frescor em peixes e moluscos cefalópodes, desenvolver e avaliar sistemas de solventes para separação de aminas biogênicas por cromatografia de camada delgada e avaliar o efeito do tempo e temperatura de derivatização sobre a conversão das aminas biogênicas em seus derivados dansilados. Derivados dansilados de agmatina (AGM), putrescina (PUT), triptamina (TRY), cadaverina (CAD), histamina (HIS), espermidina (SPD), espermina (SPM), tiramina (TYR) e feniletilamina (PHE) foram separados utilizando-se o sistema de solventes clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (6:4:1 - v/v) seguido de clorofórmio: trietilamina (6:1 - v/v). A melhor condição para derivatização das aminas biogênicas com cloreto de dansila foi 1h a 40°C. AGM permaneceu no local de aplicação ( $R_F=0,0$ ), o que indica que a metodologia deve ser utilizada com cautela para a determinação desta amina. As percentagens de recuperação de TRY, SPM, SPD e TYR foram baixas, indicando que a metodologia para extração destas aminas deve ser aperfeiçoada. BNV e TMA foram consideradas índices de frescor inadequados para bacalhau (*Gadus morhua*) e hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*). O padrão de produção mais acentuado a partir da segunda semana de armazenamento, caracterizou as aminas voláteis e as aminas biogênicas CAD e PUT como índices de deterioração para bacalhau e hadoque. Uréia se mostrou inadequada como índice de qualidade para as duas espécies de pescado estudadas. Modelos de regressão linear e quadrática indicaram um aumento progressivo dos teores de AGM em lula (*Illex coindetii*), de uréia em sépia (*Sepia officinalis*), e de BNV e triptofano livre nas duas espécies de cefalópodes desde o início do armazenamento. BNV e triptofano livre foram considerados bons índices de frescor para *I. coindetii* e *S. officinalis*, pois seus teores aumentaram significativamente ( $p<0,05$ ) desde o início do armazenamento. AGM e uréia foram consideradas índices de deterioração para *I. coindetii* e *S. officinalis*, respectivamente. Os teores de TMA (% NNP) aumentaram significativamente ( $p<0,05$ ) durante a primeira semana de armazenamento em *I. coindetii* o que sugere sua utilidade como índice de frescor para lula. Para *S. officinalis* TMA é mais adequada como índice de deterioração.

---

**Palavras-chave:** pescado, qualidade, cefalópodes, trimetilamina, cromatografia em camada delgada

## GENERAL SUMMARY

Fish and shellfish muscle is highly susceptible to spoilage during storage. Because quality quickly decreases during storage reliable chemical indices for quality and freshness evaluation are greatly needed. Total volatile bases-nitrogen (TVB-N), trimethylamine (TMA), biogenic amines, nucleotides, urea and free tryptophan have been suggested as freshness indices for fish and shellfish. Such indices are useful depending on the species, microbial flora and storage conditions. Biogenic amines levels are also cause of concernment due to their toxicological effects. The objectives of this study were to evaluate the usefulness of biogenic amines, TVB-N, TMA, free tryptophan and urea as freshness and quality indices for fish and cephalopods; to develop and evaluate solvent systems for biogenic amines separation by thin-layer chromatography; and to evaluate the effects of time and temperature of derivatisation on the conversion of biogenic amines to their dansyl derivatives. Dansyl derivatives of agmatine (AGM), putrescine (PUT), tryptamine (TRY), cadaverine (CAD), histamine (HIS), spermidine (SPD), spermine (SPM), tiramine (TYR) and phenylethylamine (PHE) were separated using the solvent system chloroform: diethyl ether: triethylamine (6:4:1 – v/v), followed by chloroform: triethylamine (6:1 – v/v). The best dansylation condition was 1h at 40°C. AGM remained at the start position, indicating the determination of AGM by this method should be considered with caution. The percentages of recovery of TRY, SPM, SPD and TYR were low, indicating that the extraction methodology must be improved. TVB-N and TMA were considered inappropriate as freshness indices for cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). CAD and PUT showed the greatest increases during the storage, but their levels did not increase significantly ( $p < 0.05$ ) during the first week. Volatile amines and biogenic amines were characterized as spoilage indices for *G. morhua* and *M. aeglefinus* due to the intense increasing of their amounts from the second week of storage. Urea was not useful as a quality index for cod and haddock. Linear and quadratic models indicated progressive increasing of AGM levels in squid (*Illex coindetii*), urea in cuttlefish (*Sepia officinalis*) and also increasing of TVB-N and free tryptophan in both cephalopods, since the beginning of the storage. TVB-N and free tryptophan were considered good freshness indices for both cephalopod species, because their levels significantly increased ( $p < 0.05$ ) during the first week of storage. AGM and urea were useful as spoilage indices for *I. coindetii* and *S. officinalis*, respectively. It was observed a significant increase of TMA (% of NNP) during the first week of storage in *I. coindetii* indicating the TMA usefulness as freshness index for squid. For *S. officinalis* TMA was a good spoilage index.

---

**Key words:** biogenic amines, freshness, fish, seafood, cephalopods, trimethylamine, urea, thin-layer chromatography

## INTRODUÇÃO GERAL

O pescado é um alimento altamente perecível devido a sua composição biológica (ASHIE et al., 1996). As alterações são causadas por enzimas endógenas, principalmente nos primeiros dias de armazenamento refrigerado, e posteriormente, a atividade bacteriana assume um papel predominante na deterioração (GARTHWAITE, 1992).

O frescor do pescado pode ser avaliado por métodos sensoriais, microbiológicos ou físico-químicos, no entanto, devido à subjetividade dos métodos sensoriais e à demora e custo elevado para execução de testes microbiológicos, métodos químicos que quantifiquem os produtos derivados da atividade enzimática endógena e bacteriana têm sido desenvolvidos e empregados na avaliação do frescor do pescado. Muitos índices químicos para controle de qualidade de peixes, moluscos e crustáceos estão baseados nas alterações quantitativas ou qualitativas de compostos da fração nitrogenada não protéica do músculo. Esta fração engloba substâncias de baixo peso molecular de diversas origens. A atividade enzimática pode causar uma alteração na concentração destes compostos ou originar outros diferentes. A detecção de alterações progressivas destas substâncias no músculo do pescado durante o armazenamento é o primeiro requisito para considerar tais substâncias como potenciais índices de frescor.

O teor de bases nitrogenadas voláteis (amônia, trimetilamina e dimetilamina), e o teor de trimetilamina têm sido empregados como índices de frescor para pescado (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001). Entretanto, existem controvérsias sobre a efetividade destes parâmetros, uma vez que em algumas espécies de pescado, alterações significativas nos teores destes compostos somente ocorrem quando os sinais de deterioração já são perceptíveis sensorialmente. Uréia (LAPA-GUIMARÃES et al., 2005; OTSUKA, 1991) e aminoácidos livres como triptofano (ROMO et al., 1996, LAPA-GUIMARÃES et al., 2005) têm sido recentemente

estudados como índices de frescor principalmente para invertebrados marinhos, apresentando resultados promissores.

Aminas biogênicas são aminas não voláteis e a determinação de seus teores tem sido proposta para avaliação da qualidade do pescado (BAIXAS-NOGUERAS et al., 2002). Aminas biogênicas geralmente estão presentes em baixas quantidades em alimentos, mas elas podem ser produzidas durante o armazenamento dependendo da disponibilidade de aminoácidos livres, da presença de bactérias capazes de descarboxilar aminoácidos e de condições favoráveis para o crescimento bacteriano e produção de enzimas (HALÁSZ et al., 1994).

Embora aminas biogênicas como histamina, tiramina e putrescina sejam necessárias para funções fisiológicas no homem e em outros animais, o consumo de alimentos contendo quantidades elevadas destas aminas pode ocasionar efeitos tóxicos (BRINK et al., 1990), sendo importante um controle dos teores destas aminas em alimentos. Das aminas biogênicas que ocorrem em carne e produtos cárneos, as mais importantes são cadaverina, putrescina, tiramina, histamina, espermidina, espermina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina (ZEE et al., 1983). Em algumas espécies de pescado e especialmente em moluscos, a agmatina é uma das aminas biogênicas de maior importância.

Em pescado as aminas biogênicas são produzidas devido à atividade de bactérias deterioradoras que somente estão presentes em número elevado no músculo quando já podem ser detectados sinais de deterioração. Devido a esta característica, alguns autores (MACKIE et al., 1997) consideram que alterações nos teores de aminas biogênicas geralmente são mais úteis como índices de deterioração que de frescor. Entretanto, agmatina (YAMANAKA et al., 1987; PAARUP et al., 2002; RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001), cadaverina (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001) e putrescina (BAIXAS-NOGUERAS et al., 2002) têm sido consideradas bons indicadores de frescor, pois foram detectadas antes da deterioração.

Os avanços nos equipamentos e acessórios têm possibilitado a utilização da cromatografia em camada delgada (CCD) na determinação quantitativa de aminas

biogênicas (SHALABY, 1999; SHAKILA et al., 2001). Em várias técnicas de CCD ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as aminas biogênicas são convertidas para derivados antes da separação. Cloreto de dansila é o reagente mais comumente utilizado na derivatização de aminas biogênicas para amidas sulfuradas fluorescentes que são relativamente estáveis e que apresentam melhores propriedades cromatográficas (PRICE et al., 1992). Diversas combinações de tempo e temperatura têm sido empregadas para dansilação de aminas biogênicas (ROSIER & PETERGHEM, 1988; MORET & CONTE, 1996; BENCSIK et al., 1988; SHALABY, 1999; SHAKILA et al., 2001). No entanto, nenhum estudo foi encontrado na literatura a respeito do efeito destas diferentes condições sobre a máxima conversão das aminas em seus derivados dansilados.

Benzeno, um solvente extremamente tóxico, é utilizado na etapa de separação cromatográfica na técnica desenvolvida por SHALABY (1999), que é a metodologia de CCD publicada que permite a determinação simultânea do maior número de aminas biogênicas. Agmatina pode ser separada e quantificada rotineiramente através de cromatografia líquida de alta eficiência (YEN & HSIEH, 1991; MACKIE et al., 1997; PRICE et al., 1992; HAYMAN et al., 1985; BENCSIK et al., 1998), porém não foram encontrados estudos que utilizem CCD para sua determinação quantitativa. Agmatina tem sido apontada como um bom índice de frescor para algumas espécies de pescado e seria desejável determiná-la pela técnica de CCD juntamente com outras aminas.

## OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

1. Estudar a viabilidade de utilização das aminas biogênicas, trimetilamina, bases nitrogenadas voláteis e uréia como índices de frescor ou deterioração para pescado das espécies *Gadus morhua* e *Melanogrammus aeglefinus*.
2. Estudar a viabilidade de utilização de aminas biogênicas, trimetilamina, bases nitrogenadas voláteis, uréia e triptofano como índices de frescor ou deterioração para moluscos cefalópodes das espécies *Illex coindetii* e *Sepia officinalis*.
3. Aperfeiçoar a metodologia para determinação de aminas biogênicas por cromatografia de camada delgada , desenvolver e avaliar novos sistemas de solventes quanto à eficiência na separação das aminas biogênicas agmatina, cadaverina, espermina, espermidina, histamina, putrescina, tiramina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina através de e avaliar o efeito das variáveis tempo/temperatura na conversão das aminas biogênicas em seus derivados dansilados.



## CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

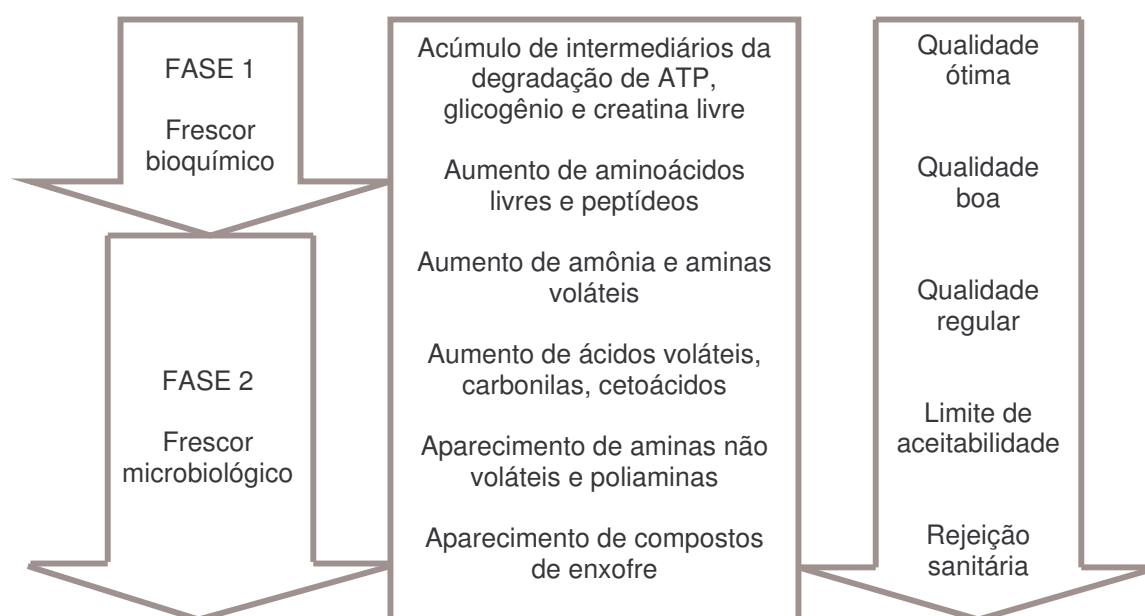
### 1.1. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE E FRESCOR DO PESCADO

Entre os produtos de origem animal, o pescado é um dos mais susceptíveis ao processo de deterioração, devido ao pH próximo à neutralidade, à alta atividade de água nos tecidos, ao teor de nutrientes facilmente utilizáveis pelos microorganismos, ao teor de lipídios insaturados, à rápida ação destrutiva das enzimas presentes nos tecidos e à alta atividade metabólica da microbiota (LISTON, 1982; SIKORSKI et al., 1994).

A perda de qualidade inicial é causada principalmente por mudanças autolíticas e não relacionadas com atividade microbiológica (GRAM & HUSS, 1996). De fato, EHIRA & UCHIYAMA (1987) relatam que os fenômenos que se desencadeiam no músculo do pescado após a captura podem ser divididos em duas etapas, denominadas frescor bioquímico e frescor microbiológico. Segundo CONTRERAS (2002), os compostos formados na primeira etapa, entre a captura e o fim do *rigor-mortis*, são de origem autolítica e sua produção não pode ser evitada, mas apenas regulada; enquanto que os compostos da segunda etapa, que compreende as mudanças de qualidade no pós-rigor, são produtos de atividade microbiana cuja formação pode ser controlada até certo limite pelo emprego de processos tecnológicos. Na fase de frescor bioquímico ocorre somente o acúmulo de intermediários da degradação do ATP, do glicogênio e creatina livre. Na fase de frescor microbiológico uma série de compostos vai sendo formada até que os limites de aceitação sejam ultrapassados. A **Figura 1.1**, adaptada de CONTRERAS (1994), mostra como estão relacionadas as fases do frescor, a qualidade sensorial e a produção de compostos indesejáveis em pescado.

A aceitação ou rejeição de um alimento para consumo é, geralmente, ditada por suas qualidades sensoriais e a segurança do consumidor depende principalmente

de sua condição microbiológica. No entanto, na maioria das situações cotidianas, a demanda de tempo necessária e os altos custos envolvidos na utilização de painéis de provadores treinados ou na execução de análises microbiológicas para avaliar a qualidade, tornam estas análises pouco práticas ou mesmo inviáveis. Testes químicos, físico-químicos ou instrumentais, que reflitam a qualidade sensorial e microbiológica podem ser uma alternativa prática e segura na determinação do frescor do pescado e de outros alimentos.



**Figura 1.1. Relação entre as fases do frescor, alteração da qualidade sensorial e produção de compostos indesejáveis em pescado e derivados (CONTRERAS GUZMÁN, 1994).**

Vários índices para controle de qualidade de peixes, moluscos e crustáceos estão baseados nas alterações quantitativas ou qualitativas de compostos da fração nitrogenada não protéica do músculo. Esta fração, chamada também generalizadamente de nitrogênio não protéico, engloba substâncias de baixo peso molecular de diversas origens que servem de substrato para enzimas endógenas ou de origem bacteriana. A atividade enzimática pode causar alterações nas concentrações destes compostos ou originar outros. A detecção de alterações

progressivas destas substâncias no músculo do pescado durante o armazenamento é o primeiro requisito para considerar tais substâncias como potenciais índices de frescor. Aminas voláteis, poliaminas ou aminas biogênicas e nucleotídeos têm sido extensivamente avaliados e empregados como índices de frescor para pescado. Uréia e aminoácidos livres como triptofano têm sido recentemente estudados como índices de frescor para invertebrados marinhos.

## 1.2. AMINAS BIOGÊNICAS

### 1.2.1. Definição e processos de formação de aminas biogênicas em alimentos

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular produzidas pelo metabolismo de plantas, animais ou microorganismos (BRINK et al., 1990). São formadas principalmente pela descarboxilação de aminoácidos ou por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (TREPTOW & ASKAR, 1986; MAIJALA et al., 1993, apud SILLA SANTOS, 1996).

Das aminas biogênicas que ocorrem em alimentos, as mais importantes são as monoaminas tiramina e feniletilamina, as diaminas cadaverina, putrescina, histamina e triptamina, e as poliaminas agmatina, espermidina e espermina. Embora as poliaminas espermidina e espermina sejam incluídas entre as aminas biogênicas por muitos autores, BARDÓCZ (1995) faz uma discriminação entre aminas biogênicas e poliaminas naturais em função do processo de síntese. Seriam consideradas aminas biogênicas somente as formadas por reações de descarboxilação não específicas, enquanto que poliaminas naturais são formadas durante a biossíntese *de novo* de poliaminas. De acordo com esta classificação espermina e espermidina não poderiam ser chamadas de aminas biogênicas.

Em alimentos frescos, aminas biogênicas podem ser geradas devido à atividade descarboxilase endógena (HALÁSZ et al., 1994) ou à ação de microorganismos

descarboxilase positivos sobre aminoácidos livres em condições favoráveis à atividade enzimática, sendo esta considerada a principal via de formação em alimentos (RICE et al., 1975, MAGA, 1978; HALÁSZ et al., 1994). Arginina pode ser facilmente convertida a agmatina por descarboxilação, ou como resultado de atividade bacteriana ser degradada a ornitina a partir da qual putrescina é formada por descarboxilação. Lisina pode ser convertida a cadaverina por ação bacteriana. Histidina, tirosina, triptofano, e fenilalanina podem, da mesma maneira gerar histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina, respectivamente (**Figura 1.2.**). Proteólise autolítica ou bacteriana tem um papel importante na liberação de aminoácidos livres dos tecidos protéicos os quais podem servir de substrato para reações de descarboxilase (SHALABY, 1996). Espermidina e espermina são formadas a partir da putrescina pela adição de um ou dois grupos aminopropil, respectivamente.

A quantidade e tipo de amina biogênica formada dependerão da composição do alimento e do tipo de microorganismo presente (HALÁSZ et al., 1994; BRINK et al., 1990). De acordo com CONTRERAS (1994) a existência de aminoácidos livres em concentrações elevadas favorece a proliferação de bactérias e induz a síntese de descarboxilases específicas. O resultado da descarboxilação é uma amina que, dependendo do peso molecular e estrutura do aminoácido que as origina, pode resultar em monoaminas, diaminas ou aminas com grupos químicos suplementares. Assim, por exemplo, no músculo de peixes escombrídeos, que contém teores elevados de histidina, a produção de histidina descarboxilase pode ser induzida e conseqüentemente pode ocorrer formação de histamina.

Embora atividade descarboxilase não esteja amplamente distribuída entre as bactérias, espécies de muitos gêneros, tais como *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*, são capazes de descarboxilar um ou mais aminoácidos. Microorganismos com atividade descarboxilase podem fazer parte da flora associada ao alimento ou podem ser introduzidos por contaminação, antes, durante ou após o processamento do alimento (BRINK et al., 1990).

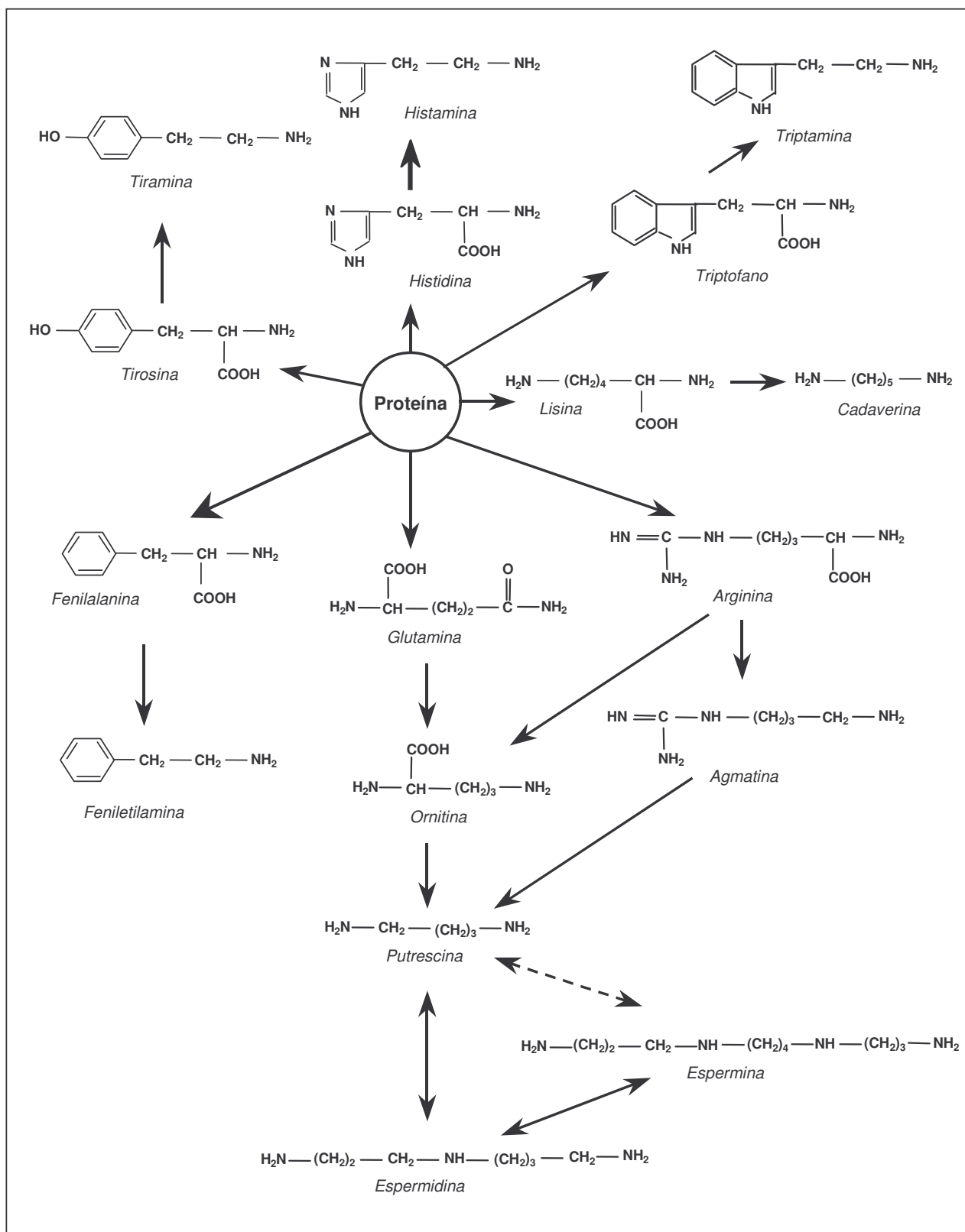


Figura 1.2. Vias metabólicas de formação de aminas biogênicas (adaptado de HALÁSZ et al., 1994).

A formação de aminas biogênicas por bactérias é influenciada pela temperatura, pH e concentração de sal. O armazenamento a baixa temperatura reduz a taxa de formação de aminas biogênicas em peixes (SHALABY, 1996). A formação de histamina em alimentos é diminuída a 10°C e controlada a 5°C devido ao crescimento lento dos microorganismos produtores de histamina a baixa temperatura (HALÁSZ et al. 1994). A atividade aminoácido descarboxilase é mais forte em ambiente ácido, com pH ótimo entre 4,0 e 5,5 (SINELL, 1978; TEODOROVIC et al., 1994, apud SILLA SANTOS, 1996).

### **1.2.2. Aspectos fisiológicos e toxicológicos**

Muitas aminas biogênicas desempenham um papel importante em funções fisiológicas do homem e de animais, tais como regulação da temperatura corporal, pH e volume do estômago, atividade cerebral (BRINK et al., 1990), pressão sanguínea, regulação da função dos ácidos nucleicos e síntese de proteínas (SMITH, 1980-81, HALÁSZ et al. 1994). Em plantas, putrescina, espermidina e espermina estão envolvidas nos processos de divisão celular, floração, desenvolvimento de frutos, resposta ao estresse e senescência (HALÁSZ et al., 1994). De acordo com BARDÓCZ (1995), a função mais importante das poliaminas é a atuação como mensageiros secundários, mediando a ação de todos os hormônios e fatores de crescimento conhecidos.

Aminas biogênicas são constituintes comuns em muitos alimentos e geralmente não representam qualquer perigo à saúde humana. Em condições normais, aminas ingeridas através dos alimentos são rapidamente metabolizadas através de reações de acetilação e oxidação mediadas por enzimas monoamino-oxidase (MAO; EC 1.4.3.4), diamino-oxidase (DAO; EC 1.4.3.6), e poliamino-oxidase (PAO; EC 1.5.3.11) (BARDÓCZ, 1995). Intoxicações por aminas biogênicas podem ocorrer quando são ingeridas em grande quantidade, quando substâncias potencializadoras estão presentes ou quando o mecanismo natural de catabolismo

de uma ou mais aminas do indivíduo é geneticamente deficiente ou inibido por agentes farmacológicos (RICE et al., 1976; SMITH, 1980-81; HALÁSZ et al.; 1994).

Os efeitos tóxicos das aminas biogênicas ocorrem geralmente devido a sua ação sobre neuro transmissores no sistema nervoso central ou sobre o sistema vascular. Tiramina é a amina biogênica mais ativa no aumento da pressão sanguínea, histamina, ao contrário, é um forte vasodilatador e pode causar hipotensão (RICE et al., 1976). Espermina possui uma marcante toxicidade renal e afeta a pressão e a coagulação sanguínea, a pulsação e a respiração (MAGA, 1978).

A rapidez com que os primeiros sintomas ocorrem após consumo de altas concentrações de histamina e tiramina sugere que, pelo menos parte da absorção ocorre na mucosa oral, desviando-se da atuação do sistema de desintoxicação intestinal e hepático (SMITH, 1980-81).

Os sintomas mais comuns que podem ocorrer após ingestão de quantidades elevadas de aminas biogênicas são náusea, desordens respiratórias, inchaço, palpitações, cefaléia, eritema da face e pescoço, hiper ou hipotensão (BRINK et al., 1990, SMITH 1980-81).

A mais freqüente intoxicação alimentar causada por aminas biogênicas é a reação alérgica à histamina. Histamina é uma substância química com poderosa atividade biológica (SHALABY, 1996), servindo como mediador primário nos sintomas imediatos das reações alérgicas e os seus efeitos são bem conhecidos, provavelmente porque na maioria dos casos de intoxicação por aminas, histamina está implicada (BRINK et al., 1990). Vômito, dores abdominais, eritema da face e dor de cabeça são os efeitos mais perceptíveis. Em casos graves, sintomas como espasmos brônquicos, sufocação e severo distúrbio respiratório têm sido relatados (SHALABY, 1996). A intoxicação por histamina é também conhecida como envenenamento por peixes escombrídeos, devido à freqüente associação da doença com o consumo de peixes da Família *Scombridae*, tais como atum,

cavalinha e bonito. Peixes da família *Cupleidae* como sardinhas também estão implicados em intoxicações por histamina (SMITH, 1980-81; SHALABY, 1996).

ARNOLD & BROWN (1978) relatam que sintomas de intoxicação por histamina foram observados após consumo de sardinha contendo 40mg de histamina. No entanto, é possível ingerir 180mg de histamina (base livre) na ausência de alimentos sem que seja percebido qualquer efeito severo, embora possa existir diferença de sensibilidade entre indivíduos. Uma vez que em muitos casos de envenenamento por peixes escombrídeos a concentração de histamina no alimento suspeito é insuficiente para provocar os sintomas observados, tem sido sugerido que outras substâncias encontradas no alimento podem atuar como sinergistas, possibilitando a absorção de quantidades de histamina maiores que aquelas absorvidas na ausência de alimentos (SMITH, 1980-81). Putrescina, cadaverina e agmatina têm sido identificadas como potencializadores que aumentam a toxicidade da histamina em humanos por deprimir sua oxidação (HALÁSZ et al., 1994).

Aminas biogênicas também estão implicadas no desenvolvimento de tumores. Diaminas como putrescina e cadaverina podem reagir com nitrito e formar nitrosaminas que são cancerígenas (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994). Por esta razão é particularmente importante prevenir o acúmulo de aminas biogênicas em produtos curados. ELIASSEN et al. (2002), referenciam diversos estudos que mostram a relação entre as poliaminas espermina, espermidina e putrescina e o crescimento de tumores. O efeito das poliaminas parece estar não apenas relacionado à proliferação e diferenciação celular, mas também ao sistema imune não específico especializado em destruição de tumores, sobre a concentração plasmática de interleucina 1 e 6 e à concentração do fator de necrose tumoral. Os efeitos da inibição da síntese e da limitação da ingestão de poliaminas em indivíduos portadores de câncer têm sido investigados na terapia do câncer (BARDÓCZ, 1995).

A avaliação da toxicidade das aminas biogênicas é extremamente difícil. A dose tóxica é altamente dependente da eficiência dos mecanismos de desintoxicação



do indivíduo (BRINK et al., 1990; HALÁSZ et al., 1994). Além disso, os efeitos da histamina e tiramina, por exemplo, podem ser potencializados pelo consumo de outros compostos. Drogas inibidoras da MAO, usadas como antidepressivos, ou no tratamento de tuberculose, diminuem a eficiência do sistema de desintoxicação (BRINK et al., 1990, SMITH, 1980-81). O consumo de bebidas alcoólicas também resulta em sensibilidade aumentada a aminas biogênicas (BRINK et al., 1990).

SHALABY (1996) referencia vários estudos e regulamentos sobre os limites aceitáveis de histamina em peixes. As orientações para histamina em peixe seriam  $<5\text{mg}/100\text{g}$  = seguro para consumo,  $5\text{-}20\text{mg}/100\text{g}$  = possivelmente tóxico,  $20\text{-}100\text{mg}/100\text{g}$  = provavelmente tóxico e  $>100\text{mg}/100\text{g}$  = tóxico e não seguro para consumo. A Comunidade Econômica Européia tem estabelecido regulamentos para espécies de peixes das famílias *Scombridae* e *Cupleidae* e fixado um plano de três classes para os níveis máximos de histamina em peixe fresco ( $n=9$ ,  $c=2$ ,  $m=100\text{ppm}$ ,  $M=200\text{ppm}$ ) e produtos de peixe maturados enzimaticamente ( $n=9$ ,  $c=2$ ,  $m=200\text{ppm}$ ,  $M=400\text{ppm}$ ), onde  $n$  é o número de unidades a serem analisadas em cada lote,  $m$  e  $M$  são os limites de tolerância e  $c$  é o número de unidades que podem conter um nível de histamina entre  $m$  e  $M$ . BAIXAS-NOGUERAS et al. (2002) citam o *Diário Oficial de las Comunidades Europeas* que estabeleceu em 1991 o limite de  $100\text{mg}$  de histamina/kg para produtos frescos ou enlatados. Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA) diminuiu o limite de alerta para histamina de  $100$  para  $50\text{mg}/\text{kg}$  e recomendou que não apenas histamina, mas também o teor de outras aminas biogênicas seja levado em consideração (FDA, 1995). No Brasil, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Portaria 185 de 1997, fixou o nível máximo de histamina a  $100\text{ppm}$  no músculo em peixes frescos das espécies pertencentes às famílias *Scombridae*, *Scombresocidae*, *Clupeidae*, *Coryyphaenidae* e *Pomatomidae* (MAPA, 1997).

### 1.2.3. Aminas biogênicas como índices de frescor

HALÁSZ et al. (1994) reportam que a determinação de aminas biogênicas é importante não somente do ponto de vista de sua toxicidade, mas também porque elas podem ser usadas como indicadoras do grau frescor ou deterioração de alimentos. Além disso, elas são estáveis ao calor, sendo por isso adequadas para avaliar a qualidade de produtos processados termicamente (ABABOUC et al., 1986).

De acordo com BRINK et al. (1990) a presença de aminas biogênicas em alimentos não fermentados é indicativa de atividade bacteriana indesejável, o que permitiria o uso do teor de aminas como indicador de deterioração microbiana.

MIETZ & KARMAS (1977) observaram que os níveis de putrescina, cadaverina e histamina aumentavam, e que espermina e espermidina diminuía em amostras deterioradas de atum em lata em comparação com amostras de boa qualidade. A partir destas observações os autores definiram o Índice QI de acordo com a fórmula:

$$QI = (\text{histamina} + \text{putrescina} + \text{cadaverina}) / (1 + \text{espermina} + \text{espermidina})$$

Peixe ou carne com valor de QI inferior a 1 é considerado de primeira qualidade, enquanto valores acima de 10 indicam uma qualidade microbiológica muito ruim. Correlações positivas entre QI e aceitabilidade ou qualidade microbiológica tem sido reportada para peixe (KARMAS, 1981).

MACKIE et al., (1997) consideram que alterações nos teores de aminas biogênicas geralmente são mais úteis como índices de deterioração que de frescor. YAMANAKA et al. (1989) estudando o músculo de lulas da espécie *Todarodes pacificus* e de vieiras (*Patinopecten yessoensis*) relataram que em carnes tratadas com cloranfenicol o número de bactérias viáveis aumentava lentamente e poliaminas eram produzidas em quantidades muito pequenas. Concluíram que poliaminas eram produzidas a partir de aminoácidos por

descarboxilases bacterianas e não por enzimas musculares endógenas. Os autores relatam, ainda, que apenas quando o total de bactérias viáveis atingiu  $10^3/\text{g}$  em lula e  $10^3\text{-}10^4/\text{g}$  em vieira a formação de poliaminas foi observada.

Entretanto, diversos estudos têm sugerido que aminas biogênicas podem servir como índices de frescor. Agmatina, putrescina, espermina e espermidina têm se mostrado de grande valor para acompanhar a evolução do frescor de invertebrados marinhos (YAMANAKA, 1990). Histamina pode ser útil como indicador de qualidade de peixes, lagosta e camarão (MIETZ & KARMAS, 1978). Agmatina foi detectada em duas espécies de lulas no início do armazenamento e considerada excelente como índice de frescor (YAMANAKA et al., 1987; PAARUP et al., 2002). Em merluza (*Merluccius merluccius*) armazenada em gelo, agmatina e também cadaverina foram consideradas bons indicativos de frescor pois foram detectadas antes da deterioração (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001).

#### **1.2.4. Cromatografia de camada delgada na determinação de aminas biogênicas**

Cromatografia engloba um grupo diverso de métodos que permitem separação, isolamento, identificação e quantificação de componentes em uma mistura (FRIED & SHERMA, 1986). Cromatografia em papel, cromatografia de camada delgada (CCD), eletroforese em camada delgada e papel, cromatografia de troca iônica, cromatografia em gel, cromatografia gasosa e líquida e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) já foram sugeridas para a identificação de aminas ou derivados de aminas (CHIN & KOEHLER, 1983). Em alimentos as aminas biogênicas geralmente ocorrem em baixas concentrações e em misturas complexas, o que exige que os métodos analíticos para sua determinação possuam alta sensibilidade e permitam o isolamento das aminas de outros constituintes que possam interferir na sua identificação e quantificação (CHIN & KOEHLER, 1983).

Durante as décadas de 70 e 80 as técnicas que empregavam CCD para determinação de amins eram apenas semi-quantitativas com níveis de detecção superiores a 1µg, geralmente apenas de uma a quatro amins eram separadas (LIEBER & TAYLOR, 1978; CHIN & KOEHLER, 1983), ou, quando se tratava de separar um número maior de amins geralmente a técnica de duplo desenvolvimento bi-dimensional era utilizada (SPINELLI et al., 1974; LAKRITZ et al., 1975). A sílica gel correspondente à região das bandas ou spots das amins era raspada das placas, as amins eram extraídas com solventes e quantificadas por fluorescência em espectrofotômetro.

Recentemente, o desenvolvimento de novas fases estacionárias para CCD e de instrumentos para aplicação de amostras e quantificação através de densitometria tem permitido obtenção de resultados similares aos obtidos com CLAE (SHAKILA et al., 2001). A CCD apresenta algumas vantagens em relação à CLAE como simplicidade de operação, possibilidade de repetir as etapas de detecção e quantificação com novos parâmetros de análise pois as frações que representam a amostra permanecem na placa, e economia, uma vez que várias amostras podem ser analisadas em uma placa com consumo de solvente baixo (JORK et al., 1990; SHERMA, 2000).

As amins puras são substâncias de alta polaridade que tendem a formar uma cauda durante o desenvolvimento cromatográfico, limitando sua resolução. Por isso elas são normalmente determinadas após sua conversão para derivados com melhores propriedades cromatográficas (HAYMAN et al., 1985). Cloreto de dansila é o reagente mais utilizado na derivatização das amins biogênicas, originando amidas sulfonadas com alta fluorescência a partir de amins primárias e secundárias. Estes derivados são relativamente estáveis, têm melhores propriedades cromatográficas e podem ser facilmente separados do produto de hidrólise, sulfonato de dansila, por extração com solventes (PRICE et al., 1992). Diversas combinações de tempo e temperatura têm sido empregadas para dansilação de amins biogênicas, tais como: 1h a 40°C (MORET & CONTE, 1996; SHALABY, 1999), 1h a 55°C (ROSIER & PETERGHEM, 1988), 1h a 56°C (BENCSEK et al., 1998), 4h (CHIN & KOEHLER, 1983) ou períodos mais longos

(MIETZ & KARMAS, 1977; HAYMAN et al., 1985; PRICE et al., 1992; PRICE & GRAY, 1993) a temperatura ambiente.

CCD é normalmente executada em uma dimensão por desenvolvimento ascendente com uma fase móvel única em uma câmara saturada com o vapor do solvente. Desenvolvimento bidimensional com uma ou várias fases móveis pode melhorar a resolução em alguns casos (SHERMA, 2000). A separação e quantificação de amins biogênicas por CCD, utilizando a técnica de desenvolvimento unidimensional parece estar limitada à separação de quatro a oito amins e o aparecimento de derivados de amônia freqüentemente interfere na separação. Tiramina, histamina, triptamina e feniletilamina foram separadas com o sistema de solventes benzeno: trietilamina (5:1 – v/v) ou clorofórmio: acetato de butila (5:1 – v/v) (CHIN & KOEHLER, 1983). Putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e tiramina foram bem resolvidas utilizando-se clorofórmio: trietilamina (4:1 – v/v) (SHAKILA et al., 2001). Oito amins biogênicas (putrescina, cadaverina, histamina, espermidina, espermina, feniletilamina, triptamina e tiramina) foram separadas através da técnica de desenvolvimento múltiplo unidimensional, usando sistemas de solventes baseados em benzeno, clorofórmio, acetona e trietilamina (SHALABY, 1999).

### 1.3. OUTROS ÍNDICES QUÍMICOS DE FRESCOR PARA O PESCADO

#### 1.3.1. Bases nitrogenadas voláteis

A concentração de amins voláteis, também chamadas bases nitrogenadas voláteis (BNV) é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a decomposição do pescado devido a sua simplicidade analítica e razoável concordância com o estado de frescor (CONTRERAS, 1994). Além da amônia, seu componente principal, as BNV incluem trimetilamina, dimetilamina (DEBEVERE & BOSKOU, 1996) e, provavelmente traços de monometilamina e propilamina, que se

formariam em etapas mais avançadas da decomposição (MOLTENO et al., 1968). AMANAJÁS (1985) relata que os métodos químicos que avaliam grupos de substâncias produzidas na deterioração representam melhor a condição geral do pescado, caso da determinação das BNV que permite quantificar uma ampla gama de metabólitos da atividade endógena (degradação autolítica) e exógena (degradação microbiana). O teor de bases nitrogenadas no músculo de pescado fresco, logo após a morte, em geral não excede o valor de 15 a 20mg de nitrogênio por 100g de músculo. O principal componente deste grupo é a amônia, particularmente no que se refere aos peixes de água doce (ZAITSEV et al., 1969, LISTON, 1982, SIKORSKI et al., 1994). De acordo com CONTRERAS (1994), o aumento de amônia pode se originar da ação das aminoidrolases sobre os nucleotídeos, desenvolvimento microbiano e hidrólise de uréia. A amônia derivada de nucleotídeos é produzida logo após a captura e em alguns casos, no esforço anterior à captura, e não deve ser considerada um reflexo da deterioração, representando, apenas, uma decomposição autolítica que não pode ser evitada. Ao longo da estocagem em gelo, o conteúdo das BNV aumenta progressivamente em função dos processos enzimáticos e microbianos sendo, assim, útil na avaliação do frescor e da deterioração do pescado (SHEWAN et al., 1962).

A determinação de BNV em pescados, embora seja largamente utilizada, é causa de controvérsia entre os pesquisadores, principalmente quanto ao estabelecimento de limites de aceitação do produto. Um valor próximo de 30mg por 100g tem se mostrado compatível com outros parâmetros de avaliação, levando alguns países, como Alemanha, Austrália e Japão a adotarem oficialmente este valor como limite máximo tolerável para a comercialização (COBB & VANDERZANT, 1975, KUAYE, 1982, SIKORSKI et al., 1994). No Brasil, a Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento também estabelece o valor de 30mg/100g como limite máximo de BNV para pescado fresco, exceto para elasmobrânquios (MAPA, 1997). CORNEJO MUJICA (2000) que estudou a formação de BNV em cação (*Prionace glauca*) comenta que parece problemático estender a adoção deste valor para todas as espécies de pescado, independentemente do conhecimento da sua

composição. Para cefalópodes, tal limite parece ser muito baixo, pois algumas espécies já atingem este teor algumas horas após a captura. KE et al. (1984) sugeriram um limite de 45mg de BNV/100g como limite de comercialização para espécies de lulas consumidas no Canadá.

### 1.3.2. Trimetilamina

A trimetilamina (TMA) se origina em pescados devido à ação de enzimas bacterianas sobre o óxido de trimetilamina (OTMA). A formação de TMA não é função direta da microbiota contaminante total, mas sim da proporção de bactérias redutoras e não redutoras de OTMA. Os principais grupos de bactérias envolvidas na redução de OTMA para TMA pertencem aos gêneros *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio* e *Acinetobacter* como gram negativas e *Micrococcus* e *Bacillus* como gram positivas, todas elas psicrófilas (LISTON, 1980), sendo que *Shewanella putrefaciens* é uma das bactérias mais representativas da produção de TMA a partir de OTMA (RINGO et al., 1984).

Existem controvérsias sobre a utilidade da TMA como índice de frescor. SMITH (1980-81) relata que o teor de TMA de peixes armazenados em condições idênticas, mas capturados em períodos diferentes não é constante e que também não pode de maneira alguma ser relacionado com a perda de OTMA, não sendo, portanto possível usar TMA como método para estimar deterioração. Já de acordo com FARBER (1965), PEDROSA-MENABRITO & REGENSTEIN (1990) e BOTTA (1995), TMA é uma das aminas voláteis mais estudadas, por estar intimamente relacionada com a deterioração do pescado. LISTON (1980) e SIKORSKI et al. (1994) relatam que há evidências de que a produção de TMA correlaciona-se bem com o aumento da população bacteriana no músculo de pescado, sendo um dos principais responsáveis pelo odor de pescado deteriorado. A diminuição da concentração de OTMA nem sempre é acompanhada por um aumento proporcional de TMA, pois esta pode se perder na água de degelo ou volatilizar

(CONTRERAS, 1994). Esta pode ser uma das razões pelas quais a TMA varia pouco em lulas refrigeradas em gelo (NAKAMURA et al., 1985; ROMO et al., 1996). KE et al. (1984) sugeriram um limite de 10mg de N-TMA/100g como limite de comercialização para espécies de lulas consumidas no Canadá.

### **1.3.3. Uréia**

Alguns autores têm sugerido que a uréia pode ser um bom índice para avaliação do frescor em invertebrados marinhos. OTSUKA et al. (1991) acompanharam a formação deste composto em espécies de caranguejo, camarão, lagosta, vieira, polvo e lula, armazenados em gelo por 15 dias, concluindo que a uréia pode ser um bom índice para avaliação do frescor nas espécies de camarão, lagosta e lula analisadas pois seu teor se elevou gradualmente durante o período de estocagem. Em lulas da espécie *Loligo plei*, armazenada em gelo sem contato direto, foi detectada uma correlação significativa entre os teores de uréia e a contagem de microorganismos psicrotróficos (LAPA-GUIMARÃES, 2005).

### **1.3.4. Triptofano**

O aumento da concentração de triptofano livre no músculo tem sido avaliado como índice de frescor para lulas. Na espécie *Dosidicus gigas* os resultados foram promissores, pois ocorreu um aumento progressivo durante 72h de armazenamento à temperatura ambiente (ROMO et al., 1996). Em *Loligo plei*, armazenada em gelo sem contato direto, foi detectada uma correlação significativa entre os teores de triptofano e a contagem de microorganismos psicrotróficos (LAPA-GUIMARÃES, 2005). Nestes dois estudos a determinação de triptofano foi realizada através do método desenvolvido por CONTRERAS & LAPA (1989), em um extrato desproteinizado do músculo das lulas. Triptofano também foi



considerado como um índice de controle potencial para merluza (*Merluccius merluccius*) pois sua concentração aumentou progressivamente durante o armazenamento sob refrigeração a  $1^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001B).

#### 1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUC, L., ALAOUI, M. M., & BUSTA, F. F. Histamine levels in commercial processed fish in Morocco. **Journal of Food Protection**, v.49, n.11, p.904–908, 1986.
- AMANAJÁS, P. P. **Determinação dos compostos básicos totais do pescado e o seu potencial para avaliação do frescor**. Campinas: UNICAMP, 1985. 110p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1985.
- ARNOLD, S. H.; BROWN, W. D. Histamine (?) toxicity from fish products. **Advances in Food Research**, v.24, n. , p.113-154, 1978.
- ASHIE, I. N. A.; SMITH, J. P. ;SIMPSON, B. K. Spoilage and shelf-life extention of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. ½, p. 87-121, 1996.
- BAIXAS-NOGUERAS, S.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, T.; VIDAL-CAROU, M.C. Chemical and sensory changes in mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6 – 8°C) and stored in ice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 6504-6510, 2002.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, n.10, p.341-346, 1995.
- BENCSEK, K., KREMMER, T., BOLDIZSÁR, M. TAMÁS, J., MÁK, M. & PÁLDI, E. High-performance liquid chromatographic determination and standardization of agmatine. **Journal of Chromatography A**, v.824, n.2, p.175-180, 1998.
- BOTTA, J. R. **Chemical methods of evaluating freshness quality**. Evaluation of seafood freshness quality. New York: VCH, 1995. p.9-33.

- BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J. & HUIS IN'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, n.1, p.73-84, 1990.
- CHIN, H. K. D. & KOEHLER, P. E. Identification and estimation of histamine, tryptamine, phenethylamine and tyramine in soy sauce by thin-layer chromatography of dansyl derivatives. **Journal of Food Science**, v.48, n.6, p.1826-1828, 1983.
- COBB III, B. F. , VANDERZANT, C. Development of a chemical test for shrimp quality. **Journal of Food Science**, v.40, n.1, p.121-124, 1975.
- CONTRERAS, G. E. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia (FUNEP), 1994. 409p.
- CONTRERAS, G. E. **Bioquímica de pescados e invertebrados**. Santiago de Chile: Centro de Estudios em Ciência y Tecnología de Alimentos, 2002. 309p.
- CONTRERAS, G. E.; LAPA GUIMARÃES, J. G. Determinação rápida de triptofano por reação com antrona. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 12., 1989, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos**. Rio de Janeiro, SBCTA, 1989. p.152.
- CORNEJO MUJICA, P. I. **Vida útil do cação (*Prionace glauca*) armazenando sob refrigeração e otimização dos métodos microbiológicos e sensoriais de avaliação da qualidade**. Tese de Doutorado, Campinas, UNICAMP, 2000, 103p.
- DEBEVERE, J. ; BOSKOU, G. Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 221-229, 1996.
- EHIRA, S.; UCHIYAMA, H. Determination of freshness using the K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. In: D. E. KRAMER & J. LISTON. **Seafood Quality Determination**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. p. 185-207, 1987.
- ELIASSEN, K. A., REISTAD, R., RISØEN, U. & RØNNING, H. F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v.78, n.3, p.273-280, 2002.
- FARBER, L. Freshness tests. In: BORGSTROM, G. (Ed). **Fish as food**. New York: Academic Press, 1965. v.4, p 65-126.
- FDA. Decomposition and histamine – Raw, frozen tuna and Mahi-mahi, canned tuna, and related species. Revised compliance guide, Availability. **Federal Register**, v. 149, p. 39754-39756, 1995.
- FRIED, B. & SHERMA, J. **Thin layer chromatography – Techniques and applications**. CAZES, J. (Ed). Chromatographic Science Series, vol. 35. New York: Marcel Dekker inc. 1986 395p.

- GATHWAITE, G. A. Chilling and freezing of fish. In: G. M. HALL. **Fish Processing Technology**. New York: VCH Publishers Inc., 1992.
- GRAM, L. & HUSS, H. H. Microbiological spoilage of fish and fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v 33, p. 121-137, 1996.
- HALÁSZ, A.; BARATH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v.5, n.2, p.42-49, 1994.
- HAYMAN, A. R., GRAY, D. O. & EVANS, S. V. New high-performance liquid chromatography system for the separation of biogenic amines as their Dns derivatives. **Journal of Chromatography**, v.325, p.462-466, 1985.
- JORK, H., FUNK, W., FISHER, W. & WIMMER H. **Thin-layer chromatography. Reagents and detection methods**. Weinheim:VCH, 1990. 464p.
- KARMAS, E. Biogenic amines as indicators of seafood freshness. **Food Science and Technology**, v.17, p. 20-23, 1981.
- KE, P. J.; BURNS, B. G.; WOYEWODA, A. D. Recommended procedures and guidelines for quality evaluation of atlantic short-fin squid (*Illex illecebrosus*). **Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, v.17, n.5, p. 276-281, 1984.
- KUAYE, A. Y. **Comparação dos métodos para determinação das bases nitrogenadas voláteis em pescado: parâmetros críticos e modificações**. Campinas, UNICAMP, 1982, 95p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.
- LAKRITZ, L.; SPINELLI, A. M.; WASSERMAN, A. E. Determination of amines in fresh and processed pork. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.23, n.2, p.344-346, 1975.
- LAPA-GUIMARÃES, J.; de FELÍCIO, P. E.; CONTRERAS, E. S. G. Chemical and microbial analyses of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice. **Food Chemistry**, v.91, n.3, p.477-483, 2005.
- LIEBER, E. R.; TAYLOR, S. L. Comparison of thin-layer chromatographic detection methods for histamine from food extracts. **Journal of Chromatography**, v.160, n.1, p.227-237, 1978.
- LISTON, J. **Recent advances in the chemistry of iced fish spoilage**. In: MARTIN, R. E. (Ed). Chemistry and biochemistry of marine food products. Westport: AVI, 1982. p. 27-37.
- LISTON, J. **Microbiology in Fishery Sciences**. In: CONNELL, J. J. (Ed) Advances in fishery science and technology. Surrey: Fishing News Books, 1980. p.138-157.

- MACKIE, I. M.; PIRIE, L.; RITCHIE, A.H. & YAMANAKA, H. The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). **Food Chemistry**, v.60, n.3, p.291-295, 1997.
- MAGA, J. A. Amines in foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.10, n.4, p.373-403, 1978.
- MALTONI, C., CILIBERTI, A., COTTI, G., CONTI, B. & BELPOGGI, F. Benzene, an experimental multipotential carcinogen: results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. **Environmental Health Perspectives**, v.82, n. , p.109-124, 1989.
- MAPA/SDP **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** / Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria 185, 1997. Disponível em: <http://paginas.terra.com.br/educacao/seafoodgroup/legisla.htm>. Acesso em: 6 maio 2005.
- MEHLMAN, M. A. Carcinogenic effects of benzene: Cesare Maltoni's contributions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.982, n. , p.137-148, 2002.
- MIETZ, J. L. & KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v.42, n.1, p.155-158, 1977.
- MIETZ, J. L. & KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.61, n.1, p.139-145, 1978.
- MOLTENO, C.; CONTRERAS-GUZMÁN, E.; REPOSI, J.; ALIAGA, H. Composición química del destilado de água de cola y su utilización en calderas. **Instituto de Fomento Pesquero**, n.18, Santiago de Chile, 1968.
- MORET, S & CONTE, L. S. High-performance liquid chromatography evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **Journal of Chromatography A**, v.729, n.1/2, p.363-369, 1996.
- NAKAMURA, K.; ISHIKAWA, S.; KIMOTO, K.; MIZUNO, Y. Changes in freshness of japanese common squid during cold storage. **Bulletin Tokai Reg. Fishery Research Lab.** v.118, p.45, 1985.
- OTSUKA, Y.; TANAKA, S.; NISHIGAKY, K.; MIYAGAWA, M. Change in the contents of arginine, ornithine and urea in the muscle of marine invertebrates stored in ice. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.56, n.6, p.863-866, 1991.
- PAARUP, T., SANCHEZ, J. A., MORAL, A., CHRISTENSEN, H., BISGAARD, M. & GRAM, L. Sensory, chemical and bacterial changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.5, p.941-950, 2002.

- PEDROSA-MENABRITO, A., REGENSTEIN, J. M. Shelf-life extension of fresh fish. A review. Spoilage of fish. **Journal of Food Quality**, v.2, n.2, p.117-127, 1988.
- PRICE, N. P. J., FIRMIN, J. L. & GRAY, D. O. Screening for amines by dansylation and automated high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.598, n.1, p.51-57, 1992.
- PRICE, N. P. J. & GRAY, D. O. Mapping of derivatised biogenic amines by two dimensional thin-layer chromatography. A comparative study. **Journal of Chromatography**, v.635, n.1, p.165-170, 1993.
- RICE, S. L.; EITENMILLER, R. R.; KOEHLER, P. E. Histamine and tyramine content of meat products. **Journal of Milk Food Technology**, v.38, n.5, p.256-258, 1975.
- RICE, S. L.; EITENMILLER, R. R.; KOEHLER, P. E. Biologically active amines in food: a review. **Journal of Milk Food Technology**, v.39, n.5, p.353-358, 1976.
- RINGO, E., STEMBERG, E., STROM, A.R. Aminoacid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens*. **Applied Enviromental Microbiology**, v.47, n.5, p.1804-1809, 1984.
- ROMO, C.; ASTUDILLO, J.; MUÑOZ, O.; CONTRERAS, E. Determinación de índices bioquímicos y funcionales relevantes para evaluar la conservación de jibia (*Dosidicus gigas*) a bordo. In: **Proceedinds of the Workshop on Fish and Mollusc Larviculture**, Santiago, p.197-213, 1996.
- ROSIER, J & PETERGHEN, C. V. A screening method for the simultaneous determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine in fish by means of high pressure liquid chromatography of their 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulphonyl derivatives. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v.186, n. , p.25-28, 1988.
- RUIZ-CAPILLAS, C. & MORAL, A. Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. **Journal of Food Science**, v.66, n.7, p.1030-1032, 2001 A.
- RUIZ-CAPILLAS, C. & MORAL, A. Changes in free amino acids during chilled storage of hake (*Merluccius merluccius* L.) in controlled atmospheres and their use as a quality control index. **European Food Research and Technology**, v. 212, p. 302–307, 2001 B.
- SHAKILA, R. J., VASUNDHARA, T. S. & KUMUDAVALLY, K. V. A comparison of the CCD-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. **Food Chemistry**, v.75, n.2, p.255-259, 2001.

- SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, n.7, p.675-690, 1996.
- SHALABY, A. R. Simple, rapid and valid thin layer chromatography method for determining biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v.65, n.1, p.117-121, 1999.
- SHERMA, J. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. **Journal of Chromatography A**, v.880, n.1/2, p.129-147, 2000.
- SHEWAN, J. M. The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. In: HOWTHORN, J. & MUIL LEITCH, J.. **Recent Advances in Food Science**, 1962.
- SIKORSKI, Z. E., KOLAKOWSKA, A., BURT, J. R. **Cambios bioquímicos y microbianos subsiguientes a la captura**. In: SIKORSKI, Z. E. (Ed). Tecnología de los productos del mar: recursos, composición y conservación. Zaragoza: Acribia, 1994. cap.4, p.73-101.
- SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, n.2/3, p.213-231, 1996.
- SMITH, T.A. Amines in food. **Food Chemistry**, v.6, n.3, p.169-200, 1980-81.
- SPINELLI, A. M., LAKRITZ, L., & WASSERMAN, A. E. Effects of processing on the amine content of pork bellies. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.22, n.6, p.1026-1029, 1974.
- YAMANAKA, H.; SHIOMI, K. & KIKUCHI, T. Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). **Journal of Food Science**, v.52, n.4, p.936-938, 1987.
- YAMANAKA, H.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T. & OKUZUMI, M. Changes in polyamine contents of common squid and scallop during storage. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.30, n.4, p.289-294, 1989.
- YAMANAKA, H. Polyamines as potential index for freshness of fish and squid. **Food Reviews International**, v.6, n.4, p.591, 1990.
- YEN, G. C.; HSIEH, C. L. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. **Journal of Food Science**, v.56, n.1, p.158-160, 1991.
- ZAITZEV, V., KIZEVETTER, I., LAGUNOV, L., MAKAROVA, T., MINDER, L., PODSEVALOV, V. Characteristics of fish as a raw material for industry. In: ZAITZEV, V. **Fish curing and processing**. Moscow: MIR, 1969.
- ZEE, J. A., SIMARD, R. E., & L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. **Journal of Food Protection**, v.46, n.12, p.1044-1049, 1983.

## **CAPÍTULO 2. SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA**

**Parte deste estudo foi publicado na revista científica Journal of Chromatography (Anexo 1).**

### **RESUMO**

A cromatografia de camada delgada tem sido considerada uma técnica confiável para separação e determinação de aminas biogênicas. No entanto, problemas como o uso de benzeno na separação das aminas e a impossibilidade de determinar agmatina ainda persistem. Os objetivos deste estudo foram desenvolver sistemas de solventes menos tóxicos e eficientes na separação de um grande número de aminas biogênicas, incluindo agmatina; e estudar o efeito de diferentes condições de tempo e temperatura sobre a máxima conversão das aminas biogênicas em seus derivados dansilados. Derivados dansilados de agmatina, putrescina, triptamina, cadaverina, histamina, espermidina, espermina, tiramina e feniletilamina foram separados usando o sistema de solventes clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (6:4:1 – v/v), seguido de clorofórmio: trietilamina (6:1 – v/v). Agmatina permaneceu na posição de aplicação, o que indica que a metodologia deve ser utilizada com cautela para a determinação desta amina. A melhor condição para dansiliação das aminas biogênicas foi o binômio 1h a 40°C. As percentagens de recuperação de triptamina, espermina, espermidina e tiramina foram baixas, indicando que a metodologia para extração destas aminas deve ser aperfeiçoada. Os coeficientes de correlação linear foram superiores a 0,99 para todas as aminas, exceto para agmatina ( $r=0,976$ ). Os limites de detecção foram 10ng para triptamina, tiramina, histamina e feniletilamina e 5ng para as outras aminas. O desvio padrão relativo da repetibilidade da cromatografia para todas as aminas foi de 1,8%, e de apenas 1,0% excluindo-se agmatina. A exatidão da metodologia variou entre 106% para agmatina a 50% para triptamina. As principais vantagens desta metodologia em comparação com outros procedimentos publicados na literatura são o uso de um solvente menos tóxico (éter dietílico em substituição ao benzeno) e a capacidade de separar nove aminas biogênicas.

## SUMMARY

Thin-layer chromatography has been suggested as a reliable technique for biogenic amines separation and determination. However, problems such as the use of benzene for biogenic amines separation and the impossibility of agmatine determination still remain. The objectives of this study were to evaluate less harmful solvent systems for their ability to separate biogenic amines, including agmatine, by thin-layer chromatography and to evaluate the effects of different temperature and time conditions on the conversion of biogenic amines into their dansyl derivatives. Dansyl derivatives of agmatine, putrescine, tryptamine, cadaverine, spermidine, histamine, spermine, tyramine and  $\beta$ -phenylethylamine were separated using the solvent system chloroform-diethyl ether-triethylamine, ratio 6:4:1, followed by chloroform-triethylamine, ratio 6:1. AGM remained at the start position, indicating the determination of AGM by this method should be considered with caution. The percentages of recovery of tryptamine, spermidine, spermine and tyramine were low, indicating that the extraction methodology must be improved. Correlation coefficients of linear regressions were higher than 0.99 for all amines, except for agmatine ( $r=0.976$ ). Detection limits were 10 ng for tryptamine, tyramine, histamine and  $\beta$ -phenylethylamine, and 5 ng for the other amines. The overall repeatability of the chromatography was 1.82% when including agmatine and barely 1.02% for the other amines. The accuracy ranged from 105.97% (agmatine) to 49.92% (tryptamine). This thin-layer chromatography method was found to be an effective and precise analytical procedure to separate and determine biogenic amines. Its main advantages compared to previous procedures are that it uses less harmful solvent (diethyl ether instead of benzene) and can separate a larger group of biogenic amines.



## 2.1. INTRODUÇÃO

Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular que podem ser formadas e degradadas durante o metabolismo celular em plantas, animais e microorganismos (BRINK et al., 1990). Aminas biogênicas geralmente estão presentes em baixas quantidades em alimentos, mas podem ser produzidas durante o armazenamento, dependendo da disponibilidade de aminoácidos livres, da presença de bactérias capazes de descarboxilar aminoácidos e de condições favoráveis para o crescimento bacteriano e produção de enzimas (HALÁSZ et al., 1994). Das aminas biogênicas que ocorrem em carne e produtos cárneos, as mais importantes são cadaverina, putrescina, tiramina, histamina, espermidina, espermina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina (ZEE et al., 1983). Em algumas espécies de pescados e especialmente em moluscos, a agmatina é uma outra amina biogênica importante.

Embora aminas biogênicas como histamina, tiramina e putrescina sejam necessárias para funções fisiológicas no homem e em outros animais, o consumo de alimentos contendo quantidades elevadas destas aminas pode ocasionar efeitos toxicológicos (BRINK et al., 1990). A intoxicação por histamina é bastante conhecida e tem sido associada ao consumo de peixes da família *Scombridae* e *Clupeidae*, cuja característica da carne é o elevado teor do aminoácido histidina que pode ser convertido à histamina.

HALÁSZ et al. (1994) relatam que a quantificação das aminas biogênicas histamina, tiramina, agmatina, putrescina, cadaverina, espermidina e espermina é importante não somente pela sua toxicidade, mas também porque elas podem ser indicadoras do grau de frescor ou deterioração de um alimento. Vários estudos (MIETZ & KARMAS, 1977; FERNÁNDEZ-SALGUERO & MACKIE, 1987; YAMANAKA, 1989; RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001) têm mostrado que a produção de algumas aminas biogênicas está relacionada à deterioração do pescado. Autores como MACKIE et al. (1997) consideram que aminas biogênicas geralmente são mais úteis como índices de deterioração que de frescor de

pescados, uma vez que são produzidas devido à atividade de bactérias deterioradoras, que somente estão presentes em número significativo no músculo quando já podem ser detectados sinais de deterioração. Entretanto, agmatina foi detectada em duas espécies de lulas no início do armazenamento e considerada excelente como índice de frescor (YAMANAKA et al., 1987; PAARUP et al., 2002) e em merluza (*Merluccius merluccius*) armazenada em gelo, agmatina e também cadaverina foram consideradas bons indicativos de frescor pois foram detectadas antes da deterioração (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001).

Várias técnicas de cromatografia podem ser utilizadas na determinação de aminas biogênicas. Recentemente, os avanços nos equipamentos e acessórios têm possibilitado a utilização da cromatografia em camada delgada (CCD) na determinação quantitativa de aminas biogênicas (SHALABY, 1999; SHAKILA et al., 2001). Cloreto de dansila é o reagente mais comumente utilizado na derivatização de aminas biogênicas (PRICE et al., 1992). Ao reagir com aminas primárias e secundárias são formadas amidas sulfuradas fluorescentes que são relativamente estáveis e que apresentam melhores propriedades cromatográficas. Diversas combinações de tempo e temperatura têm sido empregadas para dansilação de aminas biogênicas (ROSIER & PETERGHEM, 1988; MORET & CONTE, 1996; BENCSIK et al., 1998; SHALABY, 1999; SHAKILA et al., 2001), no entanto, nenhum estudo foi encontrado na literatura a respeito do efeito destas diferentes condições sobre a máxima conversão das aminas em seus derivados dansilados, ou seja, em dansil-aminas.

Diferentes sistemas de solventes têm sido avaliados e utilizados na separação de dansil-aminas por CCD e benzeno muitas vezes faz parte da composição destes sistemas, apesar de sua extrema toxidez. Benzeno é utilizado na etapa de separação cromatográfica na técnica desenvolvida por SHALABY (1999), que é a metodologia de CCD publicada que permite a determinação simultânea do maior número de aminas biogênicas. Os primeiros estudos demonstrando que benzeno é um cancerígeno multipotencial foram relatados por Maltoni et al. (1977), citado por MALTONI et al. (1989). Atualmente está claramente estabelecida a relação entre leucemias humanas, câncer e exposição ao benzeno e sugere-se que os

níveis máximos de exposição ocupacional ao benzeno sejam de 0,004 a 0,1ppm e que, na medida do possível, qualquer exposição ao benzeno ou a produtos contendo benzeno seja evitada (MEHLMAN, 2002).

A separação e quantificação de dansil-aminas por CCD utilizando a técnica de desenvolvimento unidimensional parece estar limitada à separação de cinco (SHAKILA et al., 2001) a oito (SHALABY, 1999) aminas biogênicas, dependendo se desenvolvimento único ou múltiplo for utilizado. A completa separação das aminas biogênicas pode ser prejudicada freqüentemente pela presença de derivados de amônia. Como a presença de amônia no músculo de pescados, e, conseqüentemente, em extratos de músculos praticamente não pode ser evitada, a eficiência dos sistemas de solventes na separação das dansil-aminas e amônia precisa ser considerada. Agmatina pode ser separada e quantificada rotineiramente através de cromatografia líquida de alta performance (YEN & HSIEH, 1991; MACKIE et al., 1997; PRICE et al., 1992; HAYMAN et al., 1985; BENCSIK et al., 1998), porém não foram encontrados estudos que utilizem CCD para sua determinação quantitativa. Agmatina tem sido apontada como um bom índice de frescor para algumas espécies de pescados e seria desejável determiná-la juntamente com outras aminas biogênicas por CCD.

Os objetivos deste estudo foram:

1. Desenvolver e avaliar novos sistemas de solventes quanto à eficiência na separação das aminas biogênicas agmatina, cadaverina, espermina, espermidina, histamina, putrescina, tiramina, triptamina e  $\beta$ -feniletilamina por cromatografia de camada delgada.
2. Avaliar o efeito das variáveis tempo e temperatura na conversão das aminas biogênicas em seus derivados dansilados.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. Reagentes

Agmatina (AGM), cadaverina (CAD),  $\beta$ -feniletilamina (PHE), putrescina (PUT), tiramina (TYR), assim como o reagente 5-dimetil-aminonaftaleno-1-sulfonil (cloreto de dansila), foram obtidos da companhia Sigma-Aldrich. Espermina (SPM), espermidina (SPD), histamina (HIS) e triptamina (TRY) eram da marca Fluka. Placas de cromatografia em camada delgada (20 x 20cm e 10 x 20cm cobertas com sílica gel G60 de 0,25mm de espessura), placas de cromatografia em camada delgada de alta performance (10 x 20cm cobertas com sílica gel G60 de 0,1mm de espessura) e os demais reagentes e solventes foram obtidos da companhia Merck.

### 2.2.2. Equipamentos

Os equipamentos Automatic TLC sampler 4 e TLC scanner 3 (**Anexo 2**), controlados pelo programa WinCATS da companhia CAMAG Instruments, foram utilizados para aplicação das amostras nas placas de cromatografia e detecção e quantificação da intensidade de fluorescência das aminas dansiladas, respectivamente.

### 2.2.3. Amostras para testes

Bacalhaus eviscerados da espécie *Gadus morhua* e lulas congeladas da espécie *Illex argentinus* foram adquiridos em um estabelecimento comercial na cidade de

Uppsala, Suécia. As amostras foram transportadas para o laboratório no Departamento de Ciência de Alimentos (LMV – Institutionen for Livsmedelsvetenskap) da Universidade Sueca de Ciências Agrárias (SLU – Sveriges Lantbruksuniversitet), onde os filés dos peixes e os mantos das lulas foram retirados, cortados em pedaços e homogeneizados em processador de alimentos. Em seguida os músculos homogeneizados foram congelados e mantidos a -55°C até o momento da utilização.

#### **2.2.4. Desenvolvimento de novos sistemas de solventes para separação das aminas biogênicas por CCD**

##### *2.2.4.1. Dansilação das aminas biogênicas*

A conversão das aminas biogênicas para derivados fluorescentes foi efetuada com cloreto de dansila de acordo com a técnica utilizada por MIETZ & KARMAS (1978) com modificações. Padrões estoque de cada amina biogênica e de cloreto de amônia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), como fonte de amônia (AMM), foram preparados na concentração de 2,0mg/ml (base livre) em ácido tricloroacético (TCA) 5% e mantidos sob refrigeração. Padrões de trabalho (20µg/ml) foram preparados diluindo-se 0,1ml dos padrões estoque a 10ml com TCA 5%. Misturas de aminas biogênicas e AMM (0,25 a 50µg de cada composto por ml) foram preparadas pela mistura e diluição dos padrões estoque com volumes apropriados de TCA 5%.

Alíquotas de 1ml de padrões de aminas (20µg/ml em ácido tricloroacético 5%) e uma mistura contendo 10µg de cada amina e de amônia foram pipetadas em tubos de ensaio e adicionou-se  $\text{NaHCO}_3$  até saturação. Em seguida 1ml de cloreto de dansila (5mg/ml em acetona) foi adicionado e misturado ao conteúdo de cada tubo, utilizando-se um misturador Vortex. Os tubos foram fechados e incubados a 40°C por 1 hora para promover a reação de dansilação. Após este período, 1ml de solução de glicina (0,1g/ml) foi adicionado em cada tubo e seguiu-se um aquecimento a 40°C por mais 20min. A acetona residual foi evaporada sob um

fluxo de nitrogênio e adicionou-se 3ml de água em cada tubo. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi lavado com 2ml de éter dietílico 3 vezes para extrair as aminas dansiladas, separando-as da glicina que havia reagido com os resíduos de cloreto de dansila. Os extratos em éter dietílico foram combinados e evaporados em um fluxo de nitrogênio e o resíduo foi dissolvido em 1ml de acetato de etila. Durante todo o procedimento a exposição à luz foi minimizada.

#### *2.2.4.2. Efeito de diferentes sistemas de solventes na separação das aminas biogênicas por CCD*

Alíquotas de 10µl de acetato de etila contendo os padrões de aminas dansiladas foram aplicadas a 2cm da borda inferior das placas de cromatografia em bandas de 5mm e intervalos de 1cm, utilizando-se o equipamento Automatic TLC Sampler 4.

Seis sistemas de solventes foram testados quanto à eficiência na separação das 9 aminas biogênicas e amônia utilizando-se a técnica de desenvolvimento simples e seis sistemas foram testados utilizando-se a técnica de desenvolvimento duplo (**Tabela 2.1**). Nos dois tipos de desenvolvimento, 25ml do sistema de solventes foram adicionados em cada sulco da cuba vertical bipartida (**Anexo 2**) e a mesma foi saturada utilizando-se filtro de saturação. Após o desenvolvimento as placas foram secas naturalmente. A intensidade da fluorescência emitida pelas aminas dansiladas foi avaliada a 330nm, utilizando-se o equipamento TLC Scanner 3 com um filtro óptico K400.

**Tabela 2.1. Sistemas de solventes avaliados quanto à eficiência na separação de aminas biogênicas.**

<b>Desenvolvimento simples</b>	
<b>Sistema de solvente</b>	<b>Proporção (v/v)</b>
1A – clorofórmio : trietilamina <sup>1</sup>	(4:1)
1B – ciclohexano : acetato de etila <sup>2</sup>	(1:1)
1C – clorofórmio : éter dietílico: trietilamina	(6:4:1)
1D –éter dietílico : acetona : trietilamina <sup>3</sup>	(10:2:1)
1E – acetato de metila : hexano	(1:1)
1F – clorofórmio : éter dietílico: trietilamina	(4:1:1)
<b>Desenvolvimento duplo</b>	
<b>Sistema de solvente</b>	<b>Proporção (v/v)</b>
2A – 1 <sup>o</sup> clorofórmio : trietilamina	(4:1)
2 <sup>o</sup> éter dietílico : clorofórmio : acetona : trietilamina	(4:6:1:1)
2B – 1 <sup>o</sup> ciclohexano : acetato de etila	(1:1)
2 <sup>o</sup> éter dietílico : acetona : trietilamina	(10:2:1)
2C - 1 <sup>o</sup> clorofórmio : éter dietílico : trietilamina <sup>4</sup>	(6:4:1)
2 <sup>o</sup> éter dietílico : acetona : trietilamina	(10:2:1)
2D – 1 <sup>o</sup> clorofórmio : trietilamina	(4:1)
2 <sup>o</sup> acetato de metila : hexano	(2:3)
2E – 1 <sup>o</sup> acetato de metila : hexano	(1:1)
2 <sup>o</sup> éter dietílico : acetona : trietilamina	(10:2:1)
2F - 1 <sup>o</sup> clorofórmio : éter dietílico: trietilamina	(6:4:1)
2 <sup>o</sup> clorofórmio : trietilamina	(6:1)

<sup>1</sup>SHAKILA et al., 2001 <sup>2</sup>BENCSEK et al., 1998 <sup>3</sup>SHALABY 1994 (substituindo benzeno por éter dietílico) <sup>4</sup>SHALABY 1999 (substituindo benzeno por éter dietílico)

#### 2.2.4.3. Efeito do tempo e temperatura de dansilação

Alíquotas de 1ml de 2 misturas de aminas biogênicas e amônia (contendo 10 e 50µg de cada composto) foram pipetadas em tubos de ensaio e adicionou-se NaHCO<sub>3</sub> até saturação. Em seguida 1ml de cloreto de dansila (5mg/ml em acetona) foi adicionado e misturado ao conteúdo de cada tubo, utilizando-se um misturador Vortex, e os tubos foram fechados. Cinco condições diferentes para dansilação foram avaliadas: 30min, 1h e 2h a 40°C, 1h a 55°C e 16h a temperatura ambiente. Após dansilação seguiu-se o procedimento descrito em 2.3.4.1. As aminas dansiladas foram aplicadas nas placas de CCD como descrito

em 2.3.4.2 e as placas foram desenvolvidas em clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (6:4:1 – v/v) por 10cm a partir na posição de aplicação e subsequentemente em clorofórmio : trietilamina (6:1 – v/v) por 17cm.

#### *2.2.4.4. Validação da metodologia - Ensaios de linearidade, precisão e acurácia*

Após padronização das condições de dansilação e separação das aminas biogênicas por CCD, foram efetuados ensaios para determinar a linearidade, precisão e acurácia do procedimento analítico.

Para determinar a linearidade do método, curvas padrão com oito concentrações na faixa entre 0,25 a 50µg/ml foram preparadas para cada amina. Padrões nas diferentes concentrações foram dansilados, aplicados (10µl) nas placas de CCD e a fluorescência de cada banda foi determinada por densitometria a 330nm. Regressões lineares, coeficientes de correlação, faixa de linearidade e limites e detecção foram determinados.

Para determinar a precisão, ou seja, a repetibilidade do procedimento analítico, misturas das aminas e amônia nas concentrações de 5, 10 e 20µg/ml foram analisadas em triplicata. Médias, desvios padrão (S.D.) e desvios padrão relativos (R.S.D.) foram determinados.

Acurácia é o grau de exatidão de um método analítico, ou seja, a proximidade entre um valor aceito como verdadeiro ou valor referência e o valor determinado. Ela é medida como a percentagem de padrão recuperado pelo ensaio, quando se adiciona o padrão em concentrações conhecidas em amostras. O International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guideline on Methodology (1997) recomenda que se colete dados de pelo menos 9 determinações de ao menos 3 concentrações cobrindo uma faixa específica (por exemplo: três repetições de três concentrações diferentes). Deste modo, um teste de recuperação de aminas adicionadas a amostras de bacalhau e lulas foi executado. Doze amostras de 10g de músculo de bacalhau foram pesadas separadamente em tubos cônicos de



plástico. Misturas de padrões de aminas nas concentrações de 0,25, 0,50 e 1mg foram adicionadas aos tubos em quadruplicata. Cada amostra foi homogeneizada com 20ml de TCA 5% por 1min usando o homogeneizador Ultra-Turrax. Após centrifugação (1200xg, 4min, 18°C) o extrato sobrenadante foi filtrado em papel filtro. O precipitado foi, em seguida, re-extraído duas vezes com 10ml de TCA 5%, centrifugado e filtrado. Os sobrenadantes das três extrações foram combinados, diluídos a 50ml com TCA 5% em balões volumétricos e mantidos sob refrigeração até o momento da análise. O mesmo procedimento foi utilizado para amostras de lulas. As concentrações finais das aminas adicionadas foram 5, 10 e 20µg/ml de extrato. As percentagens de recuperação das aminas adicionadas às amostras foram calculadas comparando-se as áreas dos picos obtidos para os extratos de bacalhau e lula com aqueles obtidos para soluções padrão da mesma concentração.

#### **2.2.5. Análise estatística**

Os resultados obtidos nos ensaios de validação da metodologia para determinação de aminas biogênicas por CCD foram analisados estatisticamente através de análise de variância univariada (ANOVA), teste de comparação de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ) e análise de regressão. Foram utilizados os programas Statistica, versão 6.0 (StatSoft, 1995, Tulsa, OK, USA) e Excel 2002 (Microsoft Corporation 1985-2001).

## 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1. Efeito dos diferentes sistemas de solventes na separação de aminas biogênicas por CCD

A eficiência dos sistemas de solventes na separação de aminas biogênicas utilizando a técnica de desenvolvimento simples pode ser observada na **Tabela 2.2** e **Figura 2.1**. O sistema de solventes 1A (clorofórmio: trietilamina, 4:1 – v/v) foi utilizado com sucesso por SHAKILA et al. (2001) na separação PUT, CAD, HIS, SPD, e TYR; entretanto, no presente estudo, foram observadas interferências na detecção de PUT e TYR devido à presença de TRY e SPM, respectivamente.

**Tabela 2.2. Valores de  $R_F$  para aminas e amônia após separação por desenvolvimento simples em CCD usando sistemas de solventes diferentes<sup>1</sup>.**

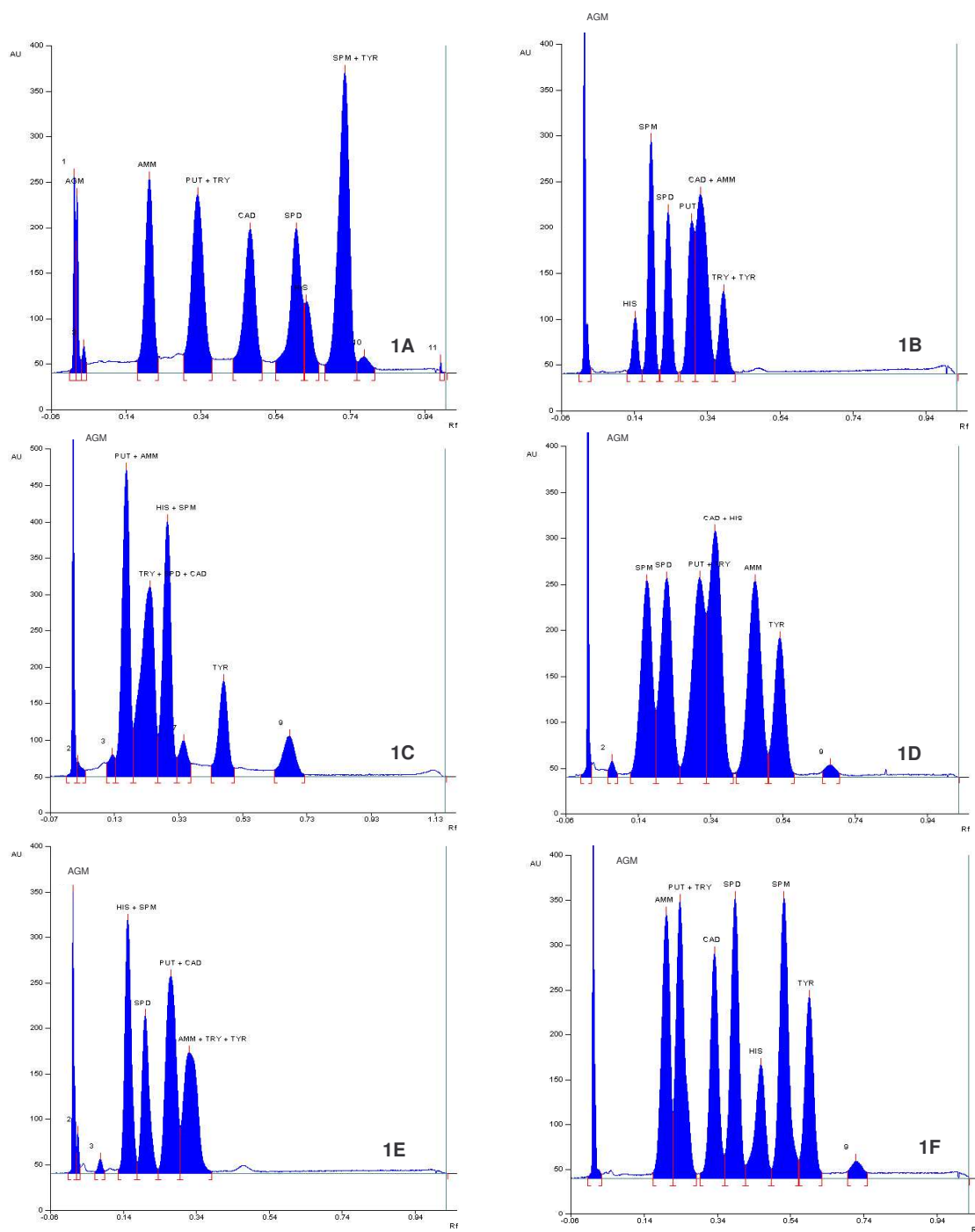
Amina biogênica/Amônia	Fator de retardo ( $R_F$ )					
	1A <sup>2</sup>	1B <sup>2</sup>	1C <sup>3</sup>	1D <sup>2</sup>	1E <sup>2</sup>	1F <sup>2</sup>
Agmatina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Amônia	0,20	<b>0,33</b>	<b>0,17</b>	0,46	<b>0,31</b>	0,18
Cadaverina	0,47	<b>0,32</b>	<b>0,25</b>	<b>0,36</b>	<b>0,27</b>	0,31
Histamina	0,63	0,14	<b>0,30</b>	<b>0,36</b>	<b>0,16</b>	0,43
Putrescina	<b>0,34</b>	<b>0,29</b>	<b>0,17</b>	<b>0,32</b>	<b>0,26</b>	<b>0,22</b>
Espermidina	0,59	0,23	<b>0,23</b>	0,22	0,20	0,36
Espermina	<b>0,73</b>	0,18	<b>0,30</b>	0,16	<b>0,15</b>	0,50
Triptamina	<b>0,32</b>	<b>0,38</b>	<b>0,22</b>	<b>0,34</b>	<b>0,34</b>	<b>0,24</b>
Tiramina	<b>0,71</b>	<b>0,38</b>	0,48	0,53	<b>0,34</b>	0,58
$\beta$ -Feniletilamina	ND	ND	ND	ND	ND	0,66

<sup>1</sup> Códigos no alto de cada coluna referem-se aos sistemas de solventes utilizados, como descrito na Tabela 2.1.

<sup>2</sup> O sistema de solventes percorreu 17cm a partir da posição de aplicação.

<sup>3</sup> O sistema de solventes percorreu 15cm a partir da posição de aplicação.

ND = não determinado. Aminas com  $R_F$ s em negrito na mesma coluna não foram bem separadas.



**Figura 2.1. Cromatogramas das aminas e amônia dansiladas após separação por CCD usando a técnica de desenvolvimento simples. 1A, 1B, 1C, 1D, 1E e 1F representam os diferentes sistemas de solventes avaliados, como descrito na Tabela 2.1. Os padrões foram preparados na concentração de 20µg/ml e 10µl (20ng) foram aplicados na placa. AGM: agmatina, PUT: putrescina, TRY: triptamina, CAD: cadaverina, SPD: espermidina, HIS: histamina, SPM: espermina, TYR: tiramina, AMM: amônia.**

O sistema de solventes 1B (ciclohexano: acetato de etila, 1:1 – v/v) retardou a eluição de HIS, SPM e SPD, as quais ficaram bem separadas. Entretanto a amônia interferiu na detecção da CAD, ambas ficaram muito próximas da PUT, e TRY e TYR não foram separadas. Este sistema de solventes foi utilizado por BENCSIK et al. (1998) para purificar AGM através de CCD. Este foi o único artigo encontrado reportando a utilização de CCD para separação de AGM de outras aminas biogênicas e reporta que dansil-AGM se encontrava perto da posição de aplicação ( $R_F = 0,1$ ) após desenvolvimento ascendente com o sistema de solventes descrito, utilizando-se placas de CCD de alta performance. No presente estudo dansil-AGM permaneceu na posição de aplicação mesmo quando o solvente 1B foi utilizado em conjunto com placas de CCD de alta performance e com todos os outros sistemas de solventes avaliados. Quando o sistema de solventes 1C foi utilizado, AMM e PUT, e HIS e SPM não foram separadas; além disso, TRY, SPD e CAD permaneceram muito próximas. No sistema 1D apenas SPD, SPM e TYR foram satisfatoriamente separadas das outras aminas biogênicas. No sistema 1E as aminas biogênicas apresentaram  $R_F$  baixo e apenas SPD foi separada das outras aminas. De todos os solventes avaliados utilizando-se a técnica de desenvolvimento simples, o sistema 1F foi o mais eficiente na separação de aminas, sendo que apenas PUT e TRY não foram totalmente separadas ( $R_F = 0,22$  e  $0,24$ , respectivamente).

Deste modo, a técnica de desenvolvimento duplo foi avaliada para a separação de aminas biogênicas por CCD e os cromatogramas obtidos podem ser observados na **Figura 2.2**.

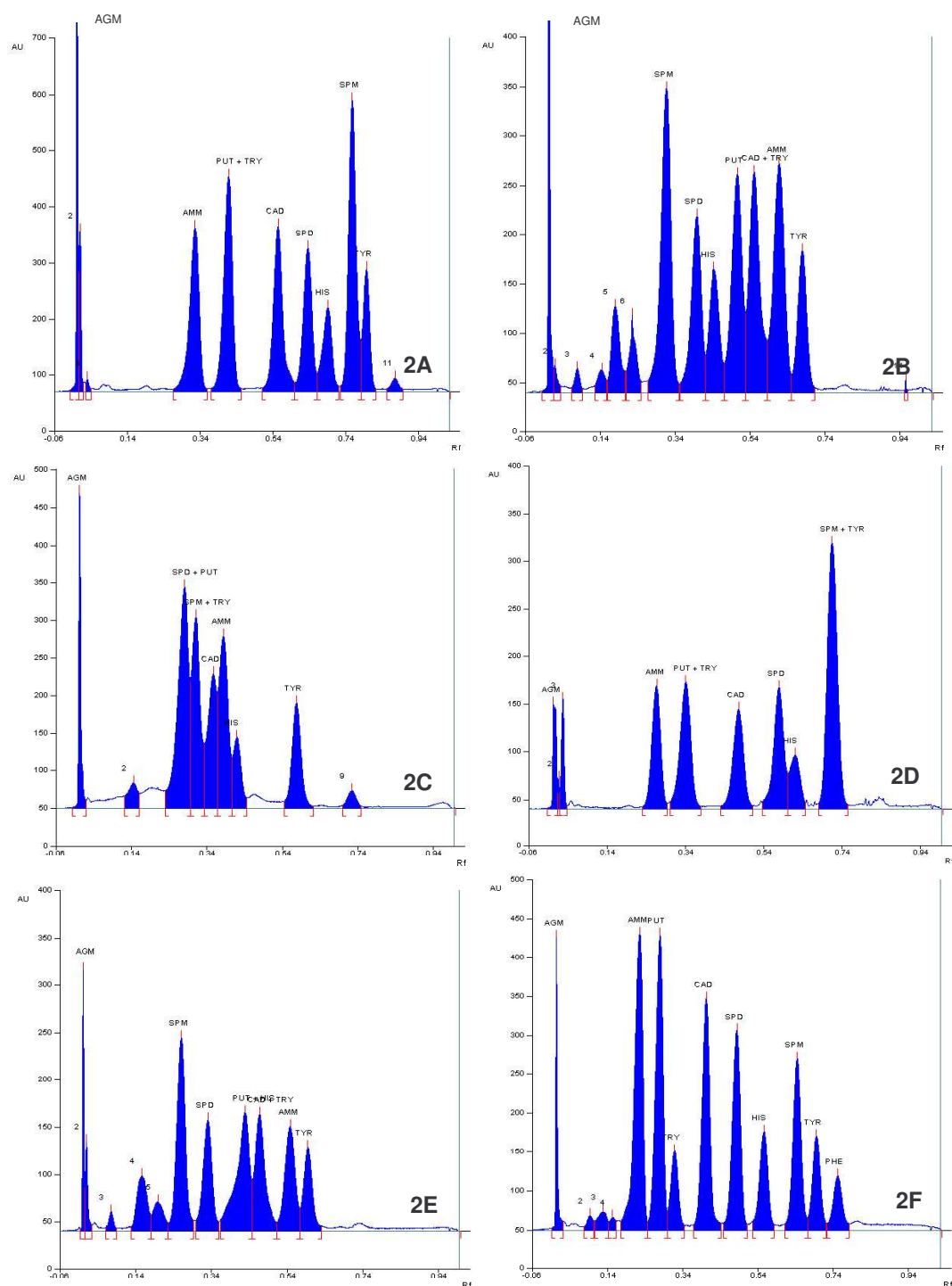
O sistema de solventes 2B representa o efeito conjunto dos sistemas 1B e 1D, os quais haviam demonstrado efeitos diferentes na separação das aminas biogênicas. SPM, SPD, HIS e TYR foram bem separadas, sem interferência da AMM, mas CAD eluiu junto com TRY e perto de PUT.

O sistema 2C foi avaliado utilizando-se um solvente menos tóxico em substituição ao benzeno, um dos solventes utilizado por SHALABY (1999) para separar aminas dansiladas. Utilizou-se éter dietílico cuja polaridade, 2,9, é similar à polaridade do

benzeno, 3,0. Apesar da alta inflamabilidade do éter dietílico, que requer precaução, sua manipulação é menos perigosa que a do benzeno. O desenvolvimento da placa utilizando o sistema 2C foi efetuado permitindo-se que os solventes ascendessem 15cm a partir da posição de aplicação, porém não ocorreu boa resolução e apenas TYR ficou separada das outras aminas e AMM.

No sistema 2D, o segundo desenvolvimento, com acetato de metila e hexano, alterou apenas levemente a separação obtida com o sistema 1A. PUT e TRY, assim como SPM e TYR permaneceram juntas e SPD e HIS não foram efetivamente separadas. PUT e HIS assim como CAD e TRY não foram separadas quando se utilizou o sistema 2E.

Os sistemas 2A e 2F foram baseados nas propriedades do sistema clorofórmio: trietilamina (1A) que promoveu uma boa separação das aminas ao longo da placa e do sistema 1C que permitiu a separação de TRY e PUT e também de SPM e TYR. O sistema 2A foi efetivo na separação de SPM e TYR, mas não promoveu a separação de TRY e PUT. O sistema 2F representou uma inversão da seqüência de solventes usada no sistema 2A, ou seja, no primeiro desenvolvimento foi utilizado o sistema composto de clorofórmio: éter dietílico: trietilamina para promover a separação da PUT e TRY e no segundo desenvolvimento o sistema clorofórmio: trietilamina, para separar as outras aminas ao longo da placa. Os melhores resultados foram obtidos quando os solventes usados no primeiro desenvolvimento da placa ascenderam 10cm a partir da posição de aplicação e foi feita uma pequena alteração na proporção dos solventes no segundo desenvolvimento: clorofórmio: trietilamina (6:1). PUT, TRY, CAD, SPD, HIS, SPM, TYR e PHE foram bem separadas, os picos apresentaram forma simétrica e não houve interferência da amônia. AGM permaneceu na posição de aplicação.



**Figura 2.2. Cromatogramas das aminas e amônia dansiladas após separação por CCD usando a técnica de desenvolvimento duplo. 2A, 2B, 2C, 2D, 2E e 2F representam os diferentes sistemas de solventes avaliados, como descrito na Tabela 2.1. Os padrões foram preparados na concentração de 20µg/ml e 10µl (20ng) foram aplicados na placa. AGM: agmatina, PUT: putrescina, TRY: triptamina, CAD: cadaverina, SPD: espermidina, HIS: histamina, SPM: espermina, TYR: tiramina, PHE: β-Feniletilamina, AMM: amônia.**

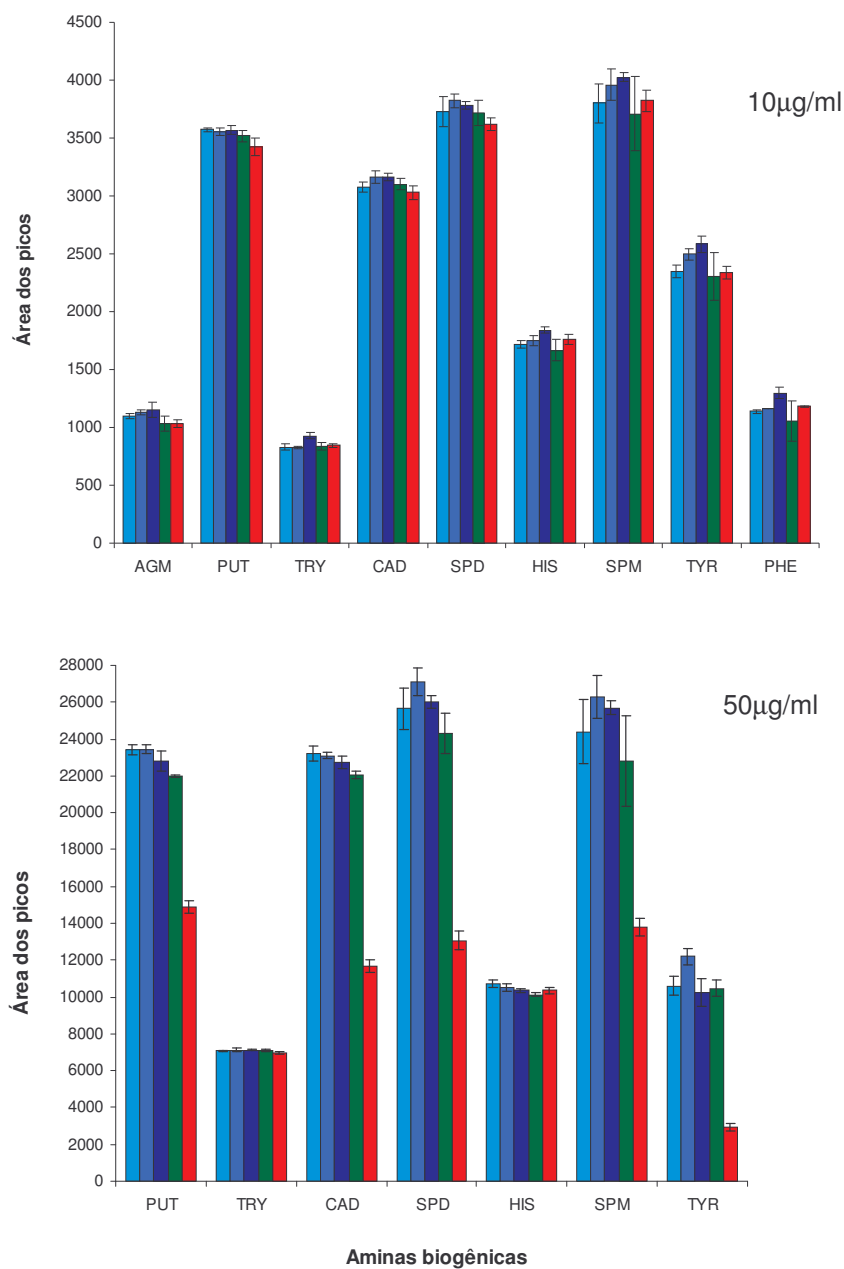
A permanência da AGM na posição de aplicação representa um sério problema para a determinação desta amina biogênica por CCD, uma vez que o produto da hidrólise do cloreto de dansila, sulfonato de dansila, também permanece na mesma posição. O uso de glicina para reagir com o excesso de cloreto de dansila e a posterior extração das aminas dansiladas com éter dietílico são essenciais para eliminar o cloreto de dansila e sulfonato de dansila, permitindo a detecção da dansil-AGM. Entretanto, compostos presentes em pescados ou outros alimentos que permaneçam na posição de aplicação podem afetar a determinação de AGM por CCD.

PRICE et al. (1992) relatam que a reação de agmatina com cloreto de dansila provoca clivagem do grupo guanido e que, em consequência, o principal produto da dansilação de agmatina é didansil-putrescina. No presente estudo nunca foram observados picos com  $R_F$  próximo ao de putrescina ou de qualquer outra dansil-amina quando padrões de dansil-agmatina foram submetidos à cromatografia.

### **2.3.2. Efeito do tempo e temperatura de dansilação**

Os efeitos do tempo e temperatura de dansilação sobre as áreas dos picos das aminas biogênicas podem ser observados na **Figura 2.3**. Para a concentração de 10µg de cada amina/ml as condições de dansilação não afetaram as áreas dos picos para AGM, SPD, SPM e TYR. Entretanto, para PUT a área do pico foi menor ( $p<0,05$ ) quando a dansilação foi efetuada a temperatura ambiente por 16h que em qualquer outra condição. Para PHE e HIS a dansilação por 2h a 40°C levou a picos com áreas maiores que por 1h a 55°C, para CAD 1h ou 2h de dansilação a 40°C foi mais eficiente que 16h a temperatura ambiente e para TRY a dansilação por 2h a 40°C foi a melhor condição. Para concentrações de aminas mais elevadas (50µg/ml) o tempo e temperatura de dansilação afetaram a área dos picos de todas as aminas, exceto AGM e TRY. As áreas dos picos de PUT, CAD, SPD, SPM e TYR foram menores ( $p<0,05$ ) quando a dansilação foi efetuada por 16h a temperatura ambiente que em qualquer outra condição. Além disso,

dansilação por 1h a 55°C resultou em picos menores que dansilação por 30min ou 1h a 40°C para PUT e CAD, e que dansilação por 1h a 40°C para SPD e TYR.



■ 30min 40°C 
 ■ 1h 40°C 
 ■ 2h 40°C 
 ■ 1h 55°C 
 ■ 16h temperatura ambiente (24°C)

**Figura 2.3. Efeito do tempo e temperatura de dansilação sobre a área dos picos das aminas dansiladas. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão. AGM: agmatina, PUT: putrescina, TRY: triptamina, CAD: cadaverina, SPD: espermidina, HIS: histamina, SPM: espermina, TYR: tiramina, PHE:  $\beta$ -Feniletilamina, AMM: amônia.  $\beta$ -Feniletilamina não foi avaliada a 50 µg/ml.**



Uma vez que dansilação a temperaturas mais altas (55°C) ou a temperatura ambiente por um período de tempo mais longo (16h) não foram vantajosas, a análise estatística foi refeita considerando-se apenas o efeito do tempo para a temperatura de 40°C. Verificou-se que as áreas dos picos dos padrões de aminas após dansilação por 30min, 1h ou 2h diferiram apenas em alguns casos. Diferenças ( $p < 0,05$ ) entre 30min e 1h de dansilação foram detectadas somente para TRY (10 e 50µg) e aumento ( $p < 0,05$ ) nos picos para 10µg de TRY, HIS e PHE foram observadas dobrando o tempo de reação de 1h para 2h. Conclui-se que a máxima conversão de AGM, PUT, CAD, SPD e SPM para seus derivados dansilados foi obtida após 30min; para TYR após 1h; e para TRY, HIS e PHE após 2h a 40°C. O desvio padrão relativo (RDS) geral para as áreas dos picos foi menor para dansilação por 1h (1,78% e 4,35% para 10 e 50µg, respectivamente) que por 2h (2,31% e 5,56% para 10 e 50µg, respectivamente), indicando que entre as condições de dansilação avaliadas 1h a 40°C é a melhor, pois foi obtida melhor repetibilidade dos resultados.

### 2.3.3. Ensaios de linearidade, precisão e acurácia

A linearidade do método foi determinada após a análise de regressão das curvas padrão obtidas para cada amina (**Figura 2.4**). Os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram maiores que 0,99 para todas as aminas exceto AGM (0,976), mostrando que as concentrações de aminas estiveram altamente correlacionadas com as áreas dos respectivos picos detectadas por densitometria (**Tabela 2.3**).

A sensibilidade do método (unidades de fluorescência por µg de amina dansilada) para cada amina pode ser determinada a partir dos coeficientes angulares das regressões lineares de cada curva padrão. As regressões lineares das curvas padrão das diaminas PUT e CAD, e das poliaminas SPD e SPM apresentaram os maiores coeficientes angulares, mostrando uma alta sensibilidade do método para estas dansil-aminas. Os limites de detecção variam de acordo com a intensidade de fluorescência e foram 5ng (0,5µg/ml - 10µl aplicados na placa) para PUT, CAD, SPD, SPM e AGM e 10ng (1µg/ml - 10µl aplicados na placa) para TRY, TYR, HIS

e PHE. A intensidade de fluorescência pode diminuir com o passar do tempo, devido à exposição à luz e inativação pela sílica, causando um decréscimo da sensibilidade. Assim, padrões devem ser aplicados em todas as placas juntamente com as amostras, tornando possível corrigir qualquer alteração de sensibilidade pela comparação de amostras com padrões submetidos às mesmas condições.

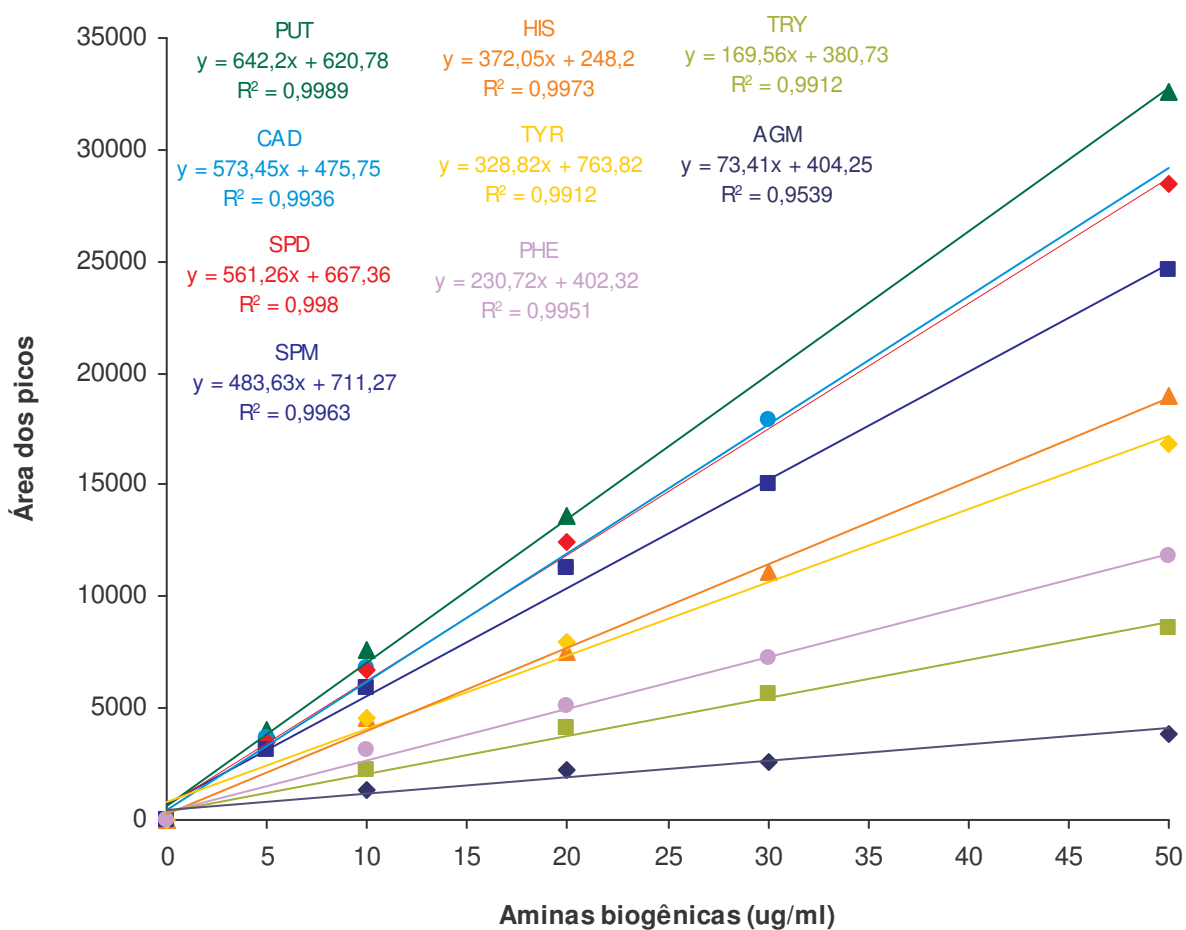


Figura 2.4. Curvas padrão de putrescina (PUT), cadaverina (CAD), espermidina (SPD), espermina (SPM), histamina (HIS), tiramina (TIR), feniletilamina (PHE), triptamina (TRY) e agmatina (AGM).

**Tabela 2.3. Linearidade da resposta do detector a 330nm e limites de detecção das aminas dansiladas.**

Amina	Coefficiente angular (S.D.) <sup>1</sup>	Intersecção (S.D.) <sup>1</sup>	Coefficiente de correlação	Faixa de linearidade (µg/ml)	Limite de detecção (ng)
Agmatina	0,60 (0,08)	6,75 (1,36)	0,9762	0,5 - 50	5
Putrescina	5,82 (0,35)	2,56 (1,50)	0,9988	0,5 - 50	5
Triptamina	1,69 (0,06)	5,40 (2,59)	0,9940	1,0 - 50	10
Cadaverina	5,60 (0,50)	8,03 (4,24)	0,9995	0,5 - 50	5
Espermidina	5,38 (0,30)	5,29 (2,91)	0,9992	0,5 - 50	5
Histamina	3,37 (0,30)	5,60 (0,50)	0,9980	1,0 - 50	10
Espermina	4,82 (0,04)	8,82 (2,45)	0,9997	0,5 - 50	5
Tiramina	3,15 (0,49)	3,72 (2,96)	0,9987	1,0 - 50	10
β-Feniletilamina	2,11 (0,33)	3,46 (2,77)	0,9985	1,0 - 50	10

<sup>1</sup> Coeficiente angular, intersecção e desvios padrão (S.D.) foram multiplicados por 10<sup>-2</sup>

O efeito das etapas de dansilação e separação cromatográfica sobre a repetibilidade geral do método foi avaliada usando-se três concentrações de aminas (**Tabela 2.4**).

Em geral, maiores desvios padrões relativos (R.S.D.) foram observados para a menor concentração (5µg). Quando os quatro padrões de mesma concentração foram dansilados e submetidos à cromatografia separadamente, o maior RSD foi detectado para 5µg de AGM/ml (19,91%) e o menor para 10µg de SPD/ml (0,76%). Analisando-se o conjunto de aminas, o valor médio de repetibilidade para 10µg foi 3,27% incluindo AGM e 2,47% sem considerar a AGM. RSD menores foram geralmente observados quando um mesmo padrão foi repetidamente submetido a cromatografia três vezes. Neste caso, o maior RSD foi novamente detectado para 5µg de AGM/ml (11,70%) e os menores para 10 e 20µg de SPD/ml (0,10%). A repetibilidade geral da etapa cromatográfica, influenciada apenas pela aplicação dos padrões nas placas, separação e detecção densitométrica apresentou um RSD igual a 1,82% incluindo-se AGM e apenas 1,02% para as outras aminas, demonstrando a alta precisão desta etapa do procedimento analítico.

**Tabela 2.4. Repetibilidade do método para determinação de aminos biogênicas por CCD, incluindo as etapas de dansilação e cromatografia e somente a etapa de cromatografia.**

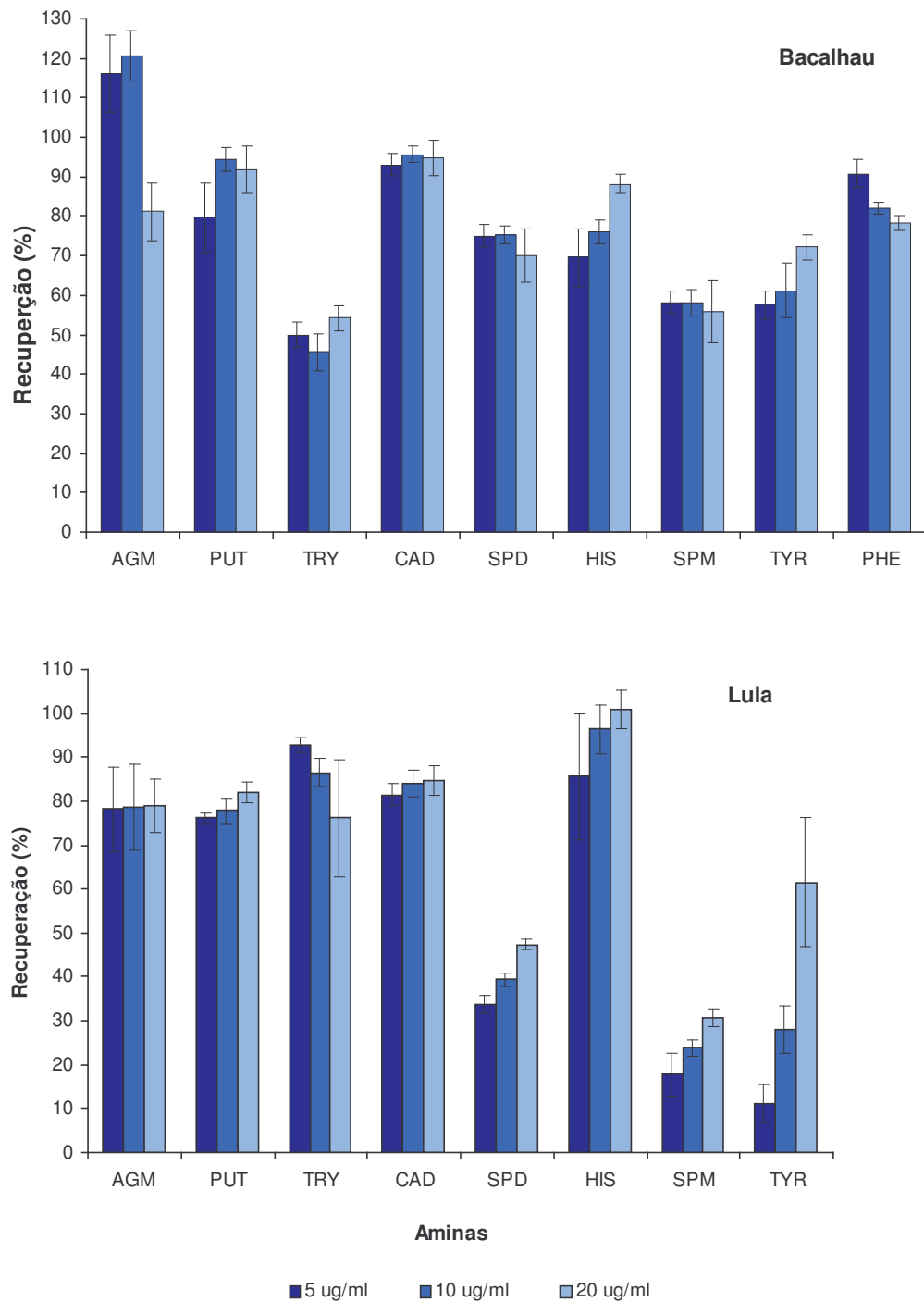
Aminas biogênicas	Concentração avaliada (µg/ml)	Concentração detectada (µg/ml)			
		Dansilação + cromatografia		Cromatografia	
		Média <sup>1</sup>	R.S.D.	Média <sup>2</sup>	R.S.D.
Agmatina	5	5.74	19.91	7.51	11.70
	10	12.79	9.62	7.47	8.63
	20	22.90	11.00	20.86	2.94
Putrescina	5	5.47	3.73	5.02	2.39
	10	10.68	2.85	10.80	0.65
	20	20.01	1.56	19.94	0.81
Tryptamina	5	5.35	4.49	4.99	2.04
	10	10.43	1.95	9.90	0.68
	20	19.84	0.99	19.69	2.23
Cadaverina	5	5.56	4.44	5.08	1.84
	10	10.53	2.34	10.85	1.28
	20	20.19	1.49	20.46	0.22
Espermidina	5	5.67	1.98	4.71	1.35
	10	10.42	0.76	10.12	0.10
	20	20.22	2.12	20.57	0.10
Histamina	5	6.34	7.83	4.88	1.4
	10	10.86	2.36	10.44	2.24
	20	21.59	3.84	19.57	1.72
Espermina	5	5.85	4.50	4.75	2.90
	10	10.36	1.23	10.11	0.13
	20	20.13	1.60	20.98	1.09
Tiramina	5	6.27	1.89	4.93	1.58
	10	10.73	3.54	10.42	1.23
	20	19.81	5.52	20.10	0.37
β-Feniletilamina	5	6.29	7.76	4.50	3.63
	10	10.83	4.75	9.83	1.84
	20	21.77	4.16	19.14	1.89

<sup>1</sup> n = 4

<sup>2</sup> n = 3

R.S.D. = desvio padrão relativo

As percentagens de recuperação dos padrões de aminos adicionados a amostras de peixe e lulas diferiram dependendo da amina e espécie animal (**Figura 2.5**). Para bacalhau as percentagens de recuperação diferiram (p<0,05) para AGM, PUT, TRY, HIS, TYR e PHE, dependendo da concentração do padrão adicionado (5, 10 ou 20µg/ml), enquanto para lula as recuperações diferiram para PUT, SPD,



**Figura 2.5.** Recuperação de padrões de aminas adicionados em bacalhau (*Gadus morhua*) e lula (*Illex argentinus*). Três concentrações diferentes foram adicionadas e as concentrações finais nos extratos foram 5, 10 e 20 µg/ml. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SD. AGM: agmatina, PUT: putrescina, TRY: triptamina, CAD: cadaverina, SPD: espermidina, HIS: histamina, SPM: espermina, TYR: tiramina, PHE:  $\beta$ -Feniletilamina.

SPM e TYR. Não foi possível verificar a ocorrência de um padrão similar na recuperação de aminos em outros trabalhos publicados na literatura, pois os trabalhos encontrados avaliaram apenas uma concentração. Considerando a média de recuperação das três concentrações, para bacalhau as maiores taxas de recuperação foram encontradas para AGM, CAD, PUT e PHE, recuperações intermediárias para HIS, SPD e TYR e as mais baixas para TRY e SPM. Para lula, as percentagens de recuperação mais altas foram encontradas para HIS, TRY e CAD, recuperações intermediárias para PUT e AGM e as mais baixas para SPD, TYR e SPM (**Tabela 2.5**). MORET & CONTE (1996) e HWANG et al. (1997) também observaram considerável variação na recuperação de aminos adicionadas a amostras de peixes.

Estudos têm mostrado que solução de TCA é o melhor solvente para extração de aminos de carne e produtos cárneos (ZEE et al., 1983) e músculo de peixes (MORET & CONTE, 1996). Entretanto, afinidade entre as aminos e a matriz protéica, e diferenças no procedimento de extração, tais como proporção de amostra e solução TCA, grau de homogeneização e separação do precipitado protéico, parecem influir consideravelmente na extração das aminos e conseqüentemente em sua recuperação.

Para AGM é importante ressaltar que as altas taxas de recuperação em bacalhau, acima de 110% para as concentrações de 5 e 10µg/ml, podem indicar que outras substâncias presentes no extrato permaneceram na posição de aplicação após a separação por CCD, afetando a determinação de AGM.

De acordo com os limites de detecção e percentagens de recuperação obtidas foram calculados os limites de quantificação das aminos biogênicas (**Tabela 2.5**). Para bacalhau os limites de determinação variaram de 0,25mg de AGM/100g até 1mg de TYR/100g. Para lula os limites de determinação variaram de 0,30mg de CAD/100g até 1,5mg de TYR/100g. Os limites de determinação para histamina, 0,64 e 0,53mg/100g para bacalhau e lula, respectivamente, permitem a quantificação desta amina biogênica em níveis inferiores a 50mg/kg, recomendado

como nível de alerta pelo Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA, 1995).

**Tabela 2.5. Percentagens médias de recuperação e limites de determinação de aminas biogênicas em bacalhau (*Gadus morhua*) e lula (*Illex argentinus*).**

Amina	Bacalhau		Lula	
	% média de recuperação	Limite de determinação (mg/100g)	% média de recuperação	Limite de determinação (mg/100g)
Agmatina	106,0	0,25	78,6	0,32
Putrescina	88,6	0,28	78,6	0,32
Triptamina	63,6	0,78	81,5	0,61
Cadaverina	94,4	0,26	83,4	0,30
Espermidina	73,5	0,34	40,2	0,62
Histamina	77,9	0,64	94,3	0,53
Espermina	54,7	0,46	24,1	1,04
Tiramina	49,9	1,00	33,5	1,51
$\beta$ -Feniletilamina	83,7	0,60	nd	nd

nd = não determinado

## 2.4. CONCLUSÕES

A técnica de desenvolvimento duplo unidimensional, utilizando o sistema de solventes clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (6:4:1 – v/v) seguido de clorofórmio: trietilamina (6:1 – v/v) foi um procedimento analítico efetivo e preciso na separação e determinação de AGM, PUT, TRY, CAD, SPD, HIS, SPM, TYR e PHE por CCD. Além das vantagens relativas a custo, simplicidade e versatilidade, as principais vantagens desta metodologia em comparação com outros procedimentos publicados na literatura são o uso de um solvente menos tóxico (éter dietílico em substituição ao benzeno) e a capacidade de separar nove aminas biogênicas. O uso desta metodologia para determinação de AGM deve ser considerado com cautela, uma vez que substâncias presentes no extrato das

amostras podem causar interferência, resultando em valores superestimados de AGM.

A técnica de desenvolvimento simples utilizando o sistema clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (4:1:1 – v/v) pode ser uma opção mais simples para separação de aminas dansiladas por CCD, em amostras onde os teores de PUT e TRY não sejam dados importantes. A linearidade, precisão e acuracidade da metodologia usando este sistema de solventes, assim como a aplicabilidade destes procedimentos para determinação de aminas em alimentos em geral deverão ser investigadas.

As percentagens de recuperação baixas observadas para TRY e SPM em bacalhau e para TYR, SPD e SPM em lula indicam que a etapa de extração deve ser aperfeiçoada.

## 2.5. REFERÊNCIAS

- BENCSIK, K., KREMMER, T., BOLDIZSÁR, M. TAMÁS, J., MÁK, M. & PÁLDI, E. High-performance liquid chromatographic determination and standardization of agmatine. **Journal of Chromatography A**, v.824, n.2, p.175-180, 1998.
- BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J. & HUIS IN'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.11, n.1, p.73-84, 1990.
- CHIN, H. K. D. & KOEHLER, P. E. Identification and estimation of histamine, tryptamine, phenethylamine and tyramine in soy sauce by thin-layer chromatography of dansyl derivatives. **Journal of Food Science**, v.48, n.6, p.1826-1828, 1983.
- FDA. Decomposition and histamine – Raw, frozen tuna and Mahi-mahi, canned tuna, and related species. Revised compliance guide, Availability. **Federal Register**, v. 149, p. 39754-39756, 1995.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. & MACKIE, I. M. Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea harengus*)



- as determined by the formation of non-volatile and volatile amines. **International Journal of Food Science and Technology**, v.22, n. , p.385-390, 1987.
- HALÁSZ, A.; BARATH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v.5, n.2, p.42-49, 1994.
- HAYMAN, A. R., GRAY, D. O. & EVANS, S. V. New high-performance liquid chromatography system for the separation of biogenic amines as their Dns derivatives. **Journal of Chromatography**, v.325, p.462-466, 1985.
- HWANG, D., CHANG, S. SHIUA, C. & CHAI, T. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. **Journal of Chromatography B**, v.693, n.1, p.23-30, 1997.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical procedures: methodology. **Federal Register**, v.62, n.96, p.27463-27467, 1997.
- MACKIE, I. M.; PIRIE, L.; RITCHIE, A.H. & YAMANAKA, H. The formation of non-volatile amines in relation to concentrations of free basic amino acids during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). **Food Chemistry**, v.60, n.3, p.291-295, 1997.
- MALTONI, C., CILIBERTI, A., COTTI, G., CONTI, B. & BELPOGGI, F. Benzene, an experimental multipotential carcinogen: results of the long-term bioassays performed at the Bologna Institute of Oncology. **Environmental Health Perspectives**, v.82, n. , p.109-124, 1989.
- MEHLMAN, M. A. Carcinogenic effects of benzene: Cesare Maltoni's contributions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.982, n. , p.137-148, 2002.
- MORET, S & CONTE, L. S. High-performance liquid chromatography evaluation of biogenic amines in foods. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. **Journal of Chromatography A**, v.729, n.1/2, p.363-369, 1996.
- PAARUP, T., SANCHEZ, J. A., MORAL, A., CHRISTENSEN, H., BISGAARD, M. & GRAM, L. Sensory, chemical and bacterial changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.5, p.941-950, 2002.
- PRICE, N. P. J., FIRMIN, J. L. & GRAY, D. O. Screening for amines by dansylation and automated high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.598, n.1, p.51-57, 1992.
- ROSIER, J & PETERGHEN, C. V. A screening method for the simultaneous determination of putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine in fish by means of high

- pressure liquid chromatography of their 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulphonyl derivatives. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v.186, n. , p.25-28, 1988.
- RUIZ-CAPILLAS, C. & MORAL, A. Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*, L.) stored in ice. **Journal of Food Science**, v.66, n.7, p.1030-1032, 2001.
- SHAKILA, R. J., VASUNDHARA, T. S. & KUMUDAVALLY, K. V. A comparison of the CCD-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. **Food Chemistry**, v.75, n.2, p.255-259, 2001.
- SHALABY, A. R. Simple, rapid and valid thin layer chromatography method for determining biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v.65, n.1, p.117-121, 1999.
- YAMANAKA, H.; SHIOMI, K. & KIKUCHI, T. Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). **Journal of Food Science**, v.52, n.4, p.936-938, 1987.
- YAMANAKA, H.; SHIMAKURA, K.; SHIOMI, K.; KIKUCHI, T. & OKUZUMI, M. Changes in polyamine contents of commom squid and scallop during storage. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v.30, n.4, p.289-294, 1989.
- YEN, G. C.; HSIEH, C. L. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. **Journal of Food Science**, v.56, n.1, p.158-160, 1991.
- ZEE, J. A., SIMARD, R. E., & L'HEUREUX, L. Evaluation of analytical methods for determination of biogenic amines in fresh and processed meat. **Journal of Food Protection**, v.46, n.12, p.1044-1049, 1983.

### **CAPÍTULO 3. TEORES DE AMINAS BIOGÊNICAS, BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS, TRIMETILAMINA E URÉIA EM BACALHAU (*Gadus morhua*) E HADOQUE (*Melanogrammus aeglefinus*) ARMAZENADOS EM GELO**

#### **RESUMO**

O pescado é um alimento altamente perecível. Mesmo quando mantido sob condições de refrigeração, a qualidade é perdida rapidamente, sendo importante dispor de métodos eficientes para a avaliação do frescor. Os teores de bases nitrogenadas voláteis (BNV) e de trimetilamina (TMA) têm sido amplamente utilizados como índices de qualidade, porém existem controvérsias sobre a significância e limitações destes índices químicos para avaliação do frescor. Aminoácidos biogênicos, como agmatina, têm sido considerados bons índices de frescor para algumas espécies de peixes, enquanto a determinação de uréia tem sido usada para invertebrados marinhos mais ainda não foi avaliada como índice de frescor para peixes. Os objetivos deste estudo foram investigar o padrão de produção de aminoácidos biogênicos, BNV, TMA e uréia em filés de bacalhau (*Gadus morhua*) e hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*) armazenados em gelo (0 – 1°C) por um período prolongado e avaliar a aplicabilidade potencial destes compostos como índices de frescor ou deterioração. Filés de *G. morhua* e *M. aeglefinus* foram armazenados em gelo e amostrados após 1, 7, 11, 13, 15, 19 e 25 dias. Os teores dos diversos compostos foram determinados em extratos do músculo em ácido tricloroacético. BNV e TMA não foram considerados bons índices de frescor para *G. morhua* e *M. aeglefinus*, uma vez que alterações significativas de seus teores durante a primeira semana de armazenamento ocorreram em apenas um experimento. Cadaverina e putrescina foram as aminoácidos biogênicos cujos teores apresentaram maior aumento durante o armazenamento, porém as alterações durante a primeira semana de armazenamento não foram significativas ( $p < 0,05$ ). O padrão de produção mais acentuado a partir da segunda semana de armazenamento, caracterizou as aminoácidos voláteis e aminoácidos biogênicos como índices de deterioração para bacalhau e hadoque. A determinação de uréia também se mostrou inadequada como índice de qualidade para as duas espécies de pescado, uma vez que este composto não apresentou um padrão de aumento ou diminuição significativo durante o armazenamento. Após 25 dias de armazenamento em gelo a concentração de histamina no músculo das duas espécies ultrapassou os limites máximos recomendados pelo Food and Drug Administration (FDA), indicando a importância do controle dos teores de aminoácidos biogênicos.

## SUMMARY

Due to the high susceptibility to spoilage, the fish quality decreases in few days even though fish is stored under refrigerated conditions. For this reason, reliable chemical indices for freshness evaluation are greatly required. Although the contents of total volatile bases-nitrogen (TVB-N) and trimethylamine (TMA) have been used as quality indices, there are disagreements about the significance and limitations of these chemical indices for fish freshness evaluation. The biogenic amine agmatine has been considered a good index for freshness evaluation of some fish species. Urea has been suggested for quality evaluation of marine invertebrate but it was not studied as freshness index for fish. The objectives of this study were to investigate the production pattern of biogenic amines, TVB-N, TMA and urea in cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) fillets stored in ice for a long period and to evaluate the usefulness of these compounds as freshness or spoilage indices. *G. morhua* and *M. aeglefinus* fillets were stored in ice (0 - 1°C) and sampled after 1, 7, 11, 13, 15, 19, and 25 days. The levels of the compounds were determined in muscle extracts in which the proteins had been precipitated with trichloroacetic acid. The levels of TVB-N and TMA significantly ( $p < 0.05$ ) increased in both fish species during the first week of storage in only one experiment, indicating these compounds are inappropriate for freshness evaluation. Cadaverine and putrescine contents showed the highest increases in cod and haddock fillets during the storage, but there was no significant ( $p < 0.05$ ) difference within the first week of storage. Volatile amines and biogenic amines were characterized as spoilage indices for *G. morhua* and *M. aeglefinus* due to the intense increasing of their amounts from the second week of storage. The urea was also not useful as quality index for these species of fish because their levels did not significantly ( $p < 0.05$ ) change during the storage period. After 25 days of storage the histamine contents in *G. morhua* and *M. aeglefinus* muscle exceeded the safety levels recommended by the Food and Drug Administration (FDA), showing the importance of the biogenic amines control.

### 3.1. INTRODUÇÃO

O pescado é considerado um dos alimentos mais perecíveis. Mesmo quando mantido sob condições de refrigeração, sua qualidade se deteriora rapidamente (GARTHWAITE, 1992), sendo a vida útil limitada por deterioração enzimática e microbiológica (ASHIE et al., 1996).

Frescor é a característica que determina a qualidade de um peixe como alimento, não apenas para aqueles consumidos crus ou usados na cozinha doméstica, mas também para aqueles que serão processados (MAZORRA-MANZANO et al., 2000). Alterações bioquímicas, químicas e sensoriais estão associadas à qualidade de peixes durante manuseio e estocagem (GILL et al., 1987; EHIRA & UCHIYAMA, 1986). No passado, muitos estudos eram baseados no conceito de que a atividade bacteriana era a única causa da deterioração (MAZORRA-MANZANO et al., 2000). Entretanto, o frescor diminui antes que os peixes se deteriorem por ação bacteriana (EHIRA & UCHIYAMA, 1986), sendo necessário diferenciar frescor e deterioração do pescado. O primeiro pode ser também chamado de frescor bioquímico ou enzimático e o último de frescor microbiológico, estimado por deterioração bacteriana.

Os métodos químicos mais comumente aplicados para estimar a qualidade do pescado baseiam-se na quantificação de aminas voláteis, as quais são normalmente produzidas durante o armazenamento refrigerado. A determinação de bases nitrogenadas voláteis (BNV) que engloba principalmente amônia, trimetilamina (TMA) e dimetilamina, e a determinação de TMA unicamente, têm sido amplamente utilizadas.

Embora comumente aplicados, existem controvérsias sobre a significância e limitações destes índices químicos de qualidade. CIVERA et al. (1995) relatam que estes índices foram adequados para avaliar o frescor durante os primeiros dias de estocagem de espécies de peixes no Mediterrâneo, mas que não eram adequados para diferenciar entre peixes com frescor intermediário e deteriorados. AMANAJÁS (1985) relata que os métodos químicos que avaliam grupos de

substâncias produzidas na deterioração representam melhor a condição geral do pescado, caso da determinação das BNV que permite quantificar uma ampla gama de metabólitos da atividade endógena (degradação autolítica) e exógena (degradação microbiana). SMITH (1980-81) relata que o teor de TMA de peixes armazenados em condições idênticas, mas capturados em períodos diferentes não é constante, e que também não pode de maneira alguma ser relacionado com a perda de OTMA, não sendo, portanto possível usar TMA como método para estimar deterioração. Já de acordo com FARBER (1965), PEDROSA-MENABRITO & REGENSTEIN (1990) e BOTTA (1995), TMA é uma das aminas voláteis mais estudadas, por estar intimamente relacionada com a deterioração do pescado. LISTON (1980) e SIKORSKI et al. (1994) relatam que há evidências de que a produção de TMA correlaciona-se bem com o aumento da população bacteriana no músculo de pescado, sendo um dos principais responsáveis pelo odor de pescado refrigerado.

O RIISPOA (BRASIL, 1980) estabelece o valor de 30mg/100g como limite máximo de BNV para pescado. No Mercado Comum Europeu as quantidades limites de 35mg de BNV e 12mg de TMA/100g são regulamentadas segundo as diretivas 95/149/EEC e 91/493/EEC, respectivamente (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001A).

Aminas biogênicas são aminas não voláteis e sua quantificação tem sido proposta como uma outra maneira de avaliar a qualidade higiênica em peixes (BAIXAS-NOGUERAS et al., 2002). Agmatina (YAMANAKA et al., 1987; PAARUP et al., 2002; RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001) putrescina (BAIXAS-NOGUERAS et al., 2002) e cadaverina (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001) têm se mostrado bons indicadores de frescor, pois foram detectadas antes da deterioração. Muitas aminas biogênicas desempenham um papel importante em funções fisiológicas do homem e de animais, tais como regulação da temperatura corporal, pH e volume do estômago, atividade cerebral (BRINK et al., 1990), pressão sanguínea, regulação da função dos ácidos nucléicos, síntese de proteínas (SMITH, 1980-81, HALÁSZ et al. 1994). Intoxicações por aminas biogênicas podem ocorrer quando são ingeridas em grande quantidade, quando substâncias potencializadoras estão presentes ou quando o mecanismo natural de catabolismo de uma ou mais

aminas do indivíduo é geneticamente deficiente ou inibido por agentes farmacológicos (RICE et al., 1976; SMITH, 1980-81; HALÁSZ et al.; 1994), o que mostra a importância da quantificação de aminas biogênicas.

Alguns autores têm sugerido que a uréia pode ser um bom índice para avaliação do frescor em invertebrados marinhos (OTSUKA et al., 1991, LAPA-GUIMARÃES et al., 2005), porém sua utilidade ainda não foi avaliada para peixes.

*Gadus morhua* e *Melanogrammus aeglefinus* são peixes marinhos da família dos bacalhaus ou *Família Gadidae*, e se distribuem por muitas regiões do Atlântico Norte, onde têm sido exploradas comercialmente (FOGARTY et al. 2001). A espécie *Gadus morhua* é conhecida internacionalmente como “Atlantic cod”. No Brasil, pode receber o nome de bacalhau do Porto ou simplesmente bacalhau, embora outros peixes, de famílias e mesmo de ordens diferentes também recebam o mesmo nome. A espécie *Melanogrammus aeglefinus* é conhecida internacionalmente como “haddock” e no Brasil como hadoque. Embora as duas espécies, principalmente *G. morhua*, tenham sido extensivamente estudadas quanto aos efeitos dos métodos de captura (BOTTA et al., 1987A e 1987B; ESAIASSEN et al., 2004) e higiene (HUSS et al., 1974) sobre a qualidade e a vida útil; técnicas para estender a vida útil (ZHANG et al., 2003); armazenamento sob atmosfera modificada (DHANANJAYA, 1994; DEBEVERE & BOSKOU, 1996); e perda de frescor (HERNÁNDEZ-HERRERO et al., 2002), as conclusões sobre a utilidade de análises como TMA, BNV e aminas biogênicas como índices de frescor para estas espécies ainda permanecem contraditórias.

As duas espécies de peixes são comercializadas como filés congelados, peixe semi-seco e salgado ou defumado. Em produtos de peixe processado a percepção sensorial de alterações relacionadas ao uso de matéria prima com baixa qualidade é mais difícil, aumentando o risco de consumo de produtos com teores elevados de aminas biogênicas.

Os objetivos deste estudo foram:

Estudar o padrão de produção de aminas biogênicas , BNV, TMA e uréia em filés de *Gadus morhua* e *Melanogrammus aeglefinus* armazenados em gelo (0 – 1°C) por períodos prolongados e avaliar a aplicabilidade potencial destes compostos como índices de frescor ou deterioração.

## 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1. Espécies, condições de armazenamento e amostragem

Bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) e hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*) (**Figura 3.1**) foram adquiridos eviscerados em um estabelecimento comercial na cidade de Uppsala, Suécia. Os peixes eram os mais frescos disponíveis e foram transportados em gelo para o laboratório no Departamento de Ciências da Carne - LMV/SLU. Os pesos médios de bacalhau e de hadoque foram 1,17kg, (variando de 1,03kg a 1,35kg) e 1,16kg (variando de 0,96kg a 1,44kg), respectivamente. Os filés foram retirados e cortados em três partes, obtendo-se seis porções de músculo de cada peixe. Porções de músculo amostradas de pelo menos 4 indivíduos e representando as diferentes partes do filé foram agrupadas, colocadas em sacos de polietileno e estocadas entre camadas de gelo (0 – 1°C) em câmara de refrigeração a 4°C. No primeiro experimento foram utilizados 4 peixes de cada espécie e amostras foram coletadas nos períodos 1, 7, 13 e 19 dias de armazenamento; no segundo experimento foram utilizados 5 peixes de cada espécie e amostras foram coletadas nos períodos 1, 7, 11, 13, 15, 19 e 25 dias de armazenamento. Em cada período de amostragem 2 sacos de polietileno contendo as porções de filé de cada espécie de peixe foram aleatoriamente retirados do armazenamento e as amostras preparadas para análise.



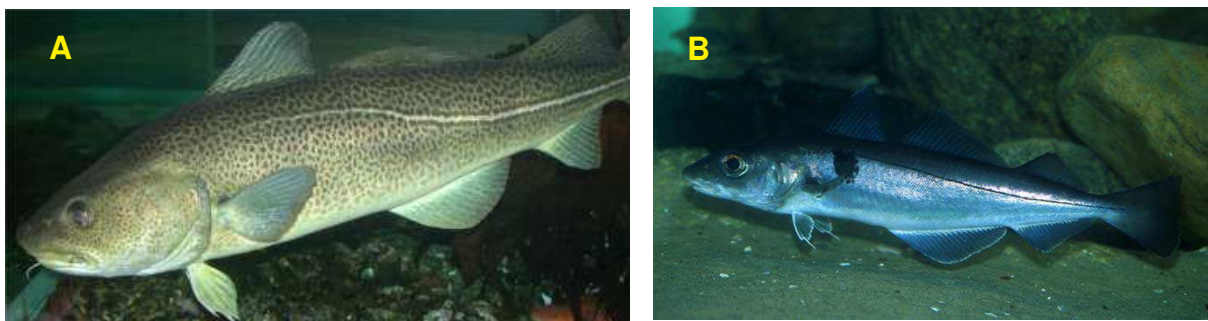


Figura 3.1. A - bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), fonte: <http://www.marine.ie> e B - hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*), fonte: <http://fishbase.org>.

### 3.2.2. Reagentes e equipamentos

Agmatina (AGM), cadaverina (CAD),  $\beta$ -feniletilamina (PHE), putrescina (PUT) tiramina (TYR), assim como os reagentes 5-dimetil-aminonaftaleno-1-sulfonil (cloreto de dansila), trimetilamina (TMA), L-triptofano, uréia, diacetilmonoxima, tiosemicarbazida e antrona foram obtidos da companhia Sigma-Aldrich. Espermina (SPM), espermidina (SPD), histamina (HIS) e triptamina (TRY) eram da marca Fluka. Placas de cromatografia em camada delgada (20 x 20cm cobertas com sílica gel G60 de 0,25mm de espessura), e os demais reagentes e solventes foram obtidos da companhia Merck.

Os equipamentos Automatic TLC sampler 4 e TLC scanner 3 controlados pelo programa WinCATS da companhia CAMAG Instruments foram utilizados para aplicação das amostras nas placas de cromatografia e detecção e quantificação da intensidade de fluorescência das aminas dansiladas, respectivamente. Um espectrofotômetro Shimadzu foi utilizado para leitura das absorbâncias nos métodos colorimétricos.

### 3.2.3. Análises químicas

#### 3.2.3.1. *Preparo das amostras para análise*

As amostras coletadas em cada período de armazenamento foram trituradas em um processador de alimentos e 10g do material homogeneizado foram transferidas para um tubo cônico de plástico e homogeneizadas com 20ml de TCA 5% por 1min usando o homogeneizador Ultra-Turrax. Após centrifugação (1200xg, 4min, 18°C) o extrato sobrenadante foi filtrado em papel filtro. O precipitado foi re-extraído duas vezes com 10ml de TCA 5%, centrifugado e filtrado. Os sobrenadantes das três extrações foram combinados, diluídos a 50ml com TCA 5% em balões volumétricos e mantidos sob refrigeração (4°C) até o momento da análise. Todas as análises químicas foram executadas em duplicata.

#### 3.2.3.2. *Determinação de aminas biogênicas*

Os teores das aminas biogênicas putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina em bacalhau e hadoque foram determinados por cromatografia de camada delgada. As aminas biogênicas foram convertidas em seus derivados fluorescentes de acordo com a técnica utilizada por MIETZ & KARMAS (1978) com modificações. Alíquotas de 1ml dos extratos em ácido tricloroacético 5% foram pipetadas em tubos de ensaio e adicionou-se  $\text{NaHCO}_3$  até saturação. Em seguida 1ml de cloreto de dansila (5mg/ml em acetona) foi adicionado e misturado ao conteúdo de cada tubo, utilizando-se um misturador Vortex. Os tubos foram incubados a 40°C por 1 hora para promover a reação de dansilação. Após este período, 1ml de solução de glicina (0,1g/ml) foi adicionado em cada tubo e seguiu-se um aquecimento a 40°C por mais 20min. A acetona residual foi evaporada sob um fluxo de nitrogênio e adicionou-se 3ml de água. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi lavado com 2ml de éter dietílico 3 vezes para extrair as aminas dansiladas. Os extratos em éter dietílico foram combinados e evaporados em fluxo de nitrogênio e o resíduo foi dissolvido em 1ml

de acetato de etila. Padrões de cada amina biogênica em concentrações de 5 a 50µg/ml em ácido tricloroacético 5% foram submetidos ao mesmo processo. Alíquotas de 10µl de acetato de etila de padrões e amostras foram aplicadas a 2cm da borda inferior das placas de cromatografia em bandas de 5mm e intervalos de 1cm, utilizando-se o equipamento Automatic TLC Sampler 4. As placas foram desenvolvidas em clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (6:4:1 – v/v) por 10cm a partir na posição de aplicação, secas, e subsequente em clorofórmio: trietilamina (6:1 – v/v) por 17cm. A intensidade da fluorescência emitida pelas aminas dansiladas foi avaliada a 330nm, utilizando-se o equipamento TLC Scanner 3. A exposição à luz foi minimizada durante todo o procedimento.

Os teores de aminas biogênicas em bacalhau e hadoque foram calculados utilizando-se as equações lineares das curvas padrão obtidas para cada amina biogênica e expressos como mg/100g de músculo, e também pelo Índice QI, definido por MIETZ & KARMAS (1977) de acordo com a fórmula:

$$QI = \frac{\text{histamina} + \text{putrescina} + \text{cadaverina}}{1 + \text{espermina} + \text{espermidina}}$$

#### *3.2.3.3. Determinação de bases nitrogenadas voláteis (BNV)*

BNV foram determinadas através do método de HOWGATE, 1976. Alíquotas de 10ml do extrato TCA foram pipetadas em tubos de digestão macro Kjeldahl e alcalinizados com óxido de magnésio (MgO). Os tubos foram acoplados a um destilador de nitrogênio marca TECATOR e seguiu-se a destilação sob fluxo de vapor. As BNV destiladas foram recebidas em ácido bórico, com indicador vermelho de metila e verde de bromocresol, até um volume de 125ml, e posteriormente tituladas com HCl 0,02N.

#### *3.2.3.4. Determinação de trimetilamina (TMA)*

TMA foi determinada colorimetricamente como picrato de TMA pelo método de DYER (1945), modificado por MURRAY & GIBSON (1972).

#### *3.2.3.5. Determinação de óxido de trimetilamina (O-TMA)*

O O-TMA foi reduzido a TMA com tricloreto de titânio e determinado colorimetricamente como picrato de TMA pelo método de DYER (1945), modificado por MURRAY & GIBSON (1972). Esta determinação foi realizada apenas para caracterização dos materiais.

#### *3.2.3.6. Determinação de uréia*

Uréia foi determinada no extrato TCA pelo método colorimétrico da diacetil monoxima, sendo usado o Kit UREA NITROGEN Cat. nº 535A da Sigma Chemical Company. Neste método a uréia reage com diacetil (formado a partir da diacetilmonoxima em meio ácido) originando uma diazina púrpura com absorbância máxima a 545nm.

#### *3.2.3.7. Determinação de nitrogênio não protéico (NNP)*

NNP foi determinado em alíquotas de 2ml do extrato TCA após digestão e destilação pelo método de Kjeldhal para determinação de nitrogênio total, HORWITZ (1980).

### **3.2.4. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância univariada (ANOVA) e teste de comparação de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ). Análise de correlação de Pearson foi utilizada para verificar correlação entre alguns índices químicos. Foram utilizados os programas Statistica, versão 6.0 (StatSoft, 1995, Tulsa, OK, USA) e Excel 2002 (Microsoft Corporation 1985-2001).

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1. Nitrogênio não protéico (NNP)

Os teores de NNP determinados em *G. morhua* no dia 1 foram 362,01 ( $\pm 13,79$ ) mg/100g e 333,63 ( $\pm 10,14$ ) mg/100g nos experimentos 1 e 2, respectivamente; e em *M. aeglefinus* foram 340,27 ( $\pm 4,17$ ) mg/100g e 344,68 ( $\pm 4,35$ ) mg/100g nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Nas duas espécies de peixes e nos dois experimentos ocorreram variações de no máximo 10% dos teores de NNP ao longo do armazenamento, porém não foi observada uma tendência de acréscimo ou decréscimo contínuo.

#### 3.3.2. Aminas biogênicas

Nas duas espécies de peixes, além de agmatina, apenas as aminas biogênicas cadaverina e putrescina foram detectadas no início do armazenamento. Na **Figura 3.2** são apresentados os perfis cromatográficos de bacalhau após 25 dias de armazenamento e de hadoque após 19 dias de armazenamento em gelo. No experimento 2 observou-se, em vários cromatogramas, o aparecimento de um pico secundário ao lado da agmatina (**Figura 3.2.A**), o que pode indicar a separação de interferentes que não foram removidos na etapa de extração das dansil-aminas e, conseqüentemente, valores super-estimados de agmatina (AGM) nos casos em que não houve esta separação (**Figura 3.2.B**). Isto poderia explicar os valores de AGM superiores a 8,5mg/100g para bacalhau e hadoque no experimento 1, contra os valores inferiores a 3,8mg/100g no experimento 2 (**Tabelas 3.1 e 3.2**). Além disso, em *G. morhua*, as variações dos teores de AGM nos dois experimentos foram contraditórias. No experimento 1 foi detectado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de AGM no dia 19. No experimento 2 houve uma tendência de decréscimo dos teores de AGM ao longo do armazenamento. Os

desvios padrões das médias foram elevados o que indica a ocorrência de problemas na determinação de AGM.

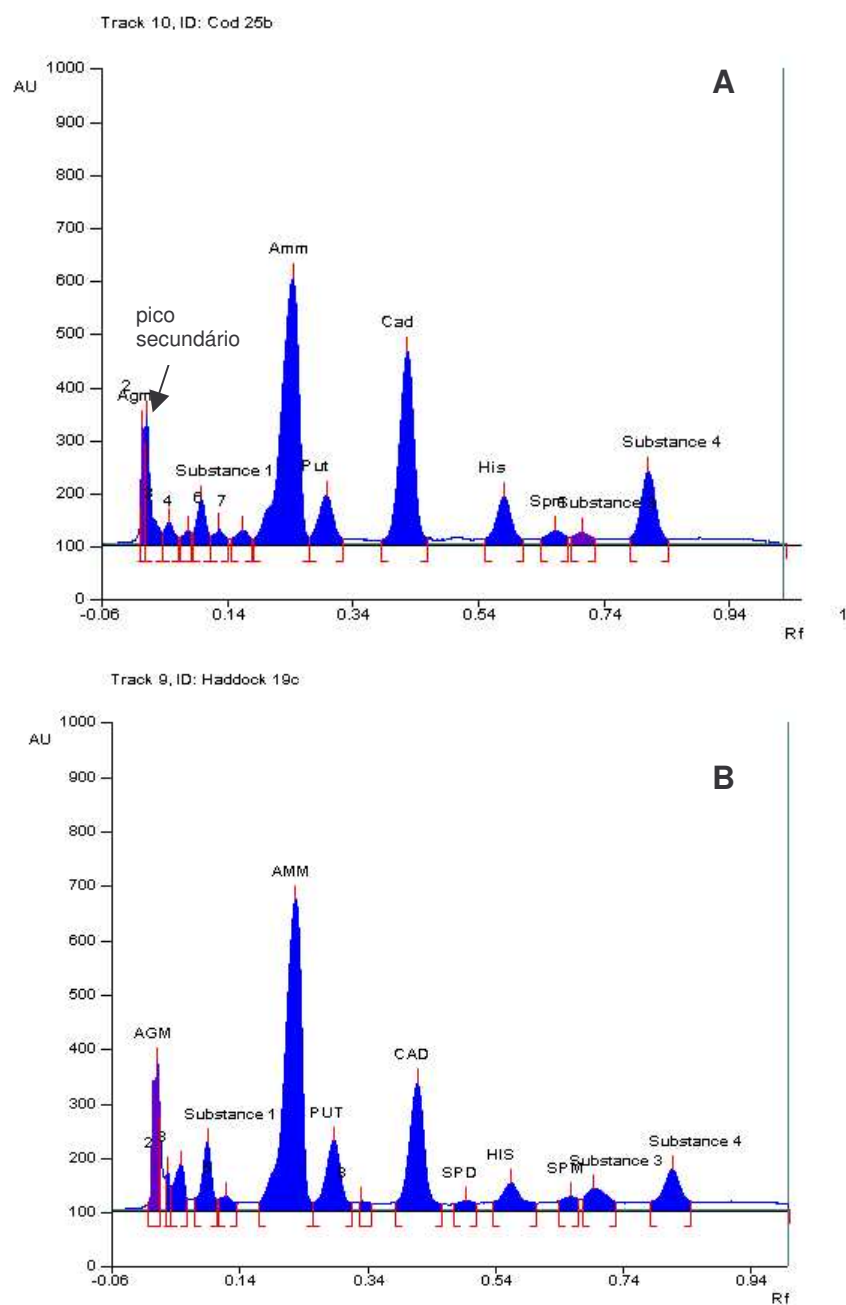


Figura 3.2. Perfis cromatográficos de bacalhau (*G. morhua*) no 25º dia de armazenamento (A) e de hadoque (*M. aeglefinus*) no 19º dia de armazenamento (B). AGM = agmatina, AMM = amônia, PUT = putrescina, CAD = cadaverina, SPD = espermidina, HIS = histamina, SPM = espermina.

Em *Merluccius merluccius*, um peixe que também pertence à ordem *Gadiformes*, RUIZ-CAPILLAS & MORAL (2002) encontraram valores variando entre 0 e 15mg de AGM/kg, com tendência de aumento dos valores até o 24º dia de armazenamento a 2°C e posterior diminuição no dia 31. Na mesma espécie de peixe armazenada a 0°C ou a 6-8°C os valores de AGM se mantiveram ao redor de 1mg/kg e atingiram valores máximos ao redor do 15º - 20º dia de armazenamento e um decréscimo posterior (BAIXAS-NOGUERAS et al., 2002). Um perfil de produção semelhante foi observado em hadoque no presente estudo, embora as concentrações de AGM/100g de músculo no experimento 1 sejam mais elevadas que no experimento 2. Uma possível explicação para este perfil seria a produção de agmatina como um metabólito intermediário na produção de putrescina a partir de arginina por alguns microorganismos (RUIZ-CAPILLAS & MORAL, 2001A). A agmatina seria mais rapidamente convertida a putrescina nas fases mais avançadas da deterioração, o que causaria uma diminuição dos seus teores.

Em *Gadus morhua* (**Tabela 3.1**) os teores de cadaverina permaneceram abaixo de 1mg/100g de músculo durante todo o período de armazenamento no experimento 1, enquanto que no experimento 2 cadaverina foi detectada a partir do dia 11 e aumentou ( $p<0,05$ ) progressivamente até o final do armazenamento atingindo o teor de 11,38mg/100g. As alterações nos teores de putrescina foram similares nos dois experimentos. No experimento 1, os teores aumentaram a partir do sétimo dia de armazenamento, porém foi detectada diferença significativa ( $p<0,05$ ) somente entre os dias 13 e 19. No experimento 2, traços de putrescina foram detectados no dia 1 e ocorreu um aumento progressivo durante o armazenamento, porém, diferenças significativas somente foram detectadas a partir do dia 11. Ainda, no experimento 2, histamina foi detectada no dia 19 e aumentou rápida e significativamente ( $p<0,05$ ) e traços de espermina foram detectados no dia 25.

Em *Melanogrammus aeglefinus* (**Tabela 3.2**) cadaverina foi detectada desde o dia 1 no experimento 1 e aumentou significativamente a partir do dia 7, enquanto que no experimento 2 foi detectada no dia 11 e atingiu teores de 6,4mg/100g. Traços de putrescina foram detectados desde o primeiro dia de armazenamento nos dois

experimentos e sua concentração aumentou progressivamente, porém diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram detectadas somente no dia 13. Histamina foi detectada no dia 15 no experimento 2 e aumentou rápida e significativamente ( $p < 0,05$ ). Traços de espermina foram detectados no dia 15, e tiramina e espermidina após este período.

Concentrações maiores de putrescina, cadaverina e histamina foram produzidas em bacalhau e hadoque a partir da segunda semana de armazenamento no experimento 2, em comparação com o experimento 1. Considerando que as condições de armazenamento foram iguais nos dois experimentos, e que aminas biogênicas são produzidas predominantemente pela atividade descarboxilase de enzimas bacterianas, tais resultados sugerem uma diferença na microbiota contaminante em bacalhau e hadoque no início do experimento. Uma carga microbiológica maior, ou a presença predominante de bactérias produtoras de enzimas capazes de descarboxilar arginina, glutamina, lisina e histidina no pescado utilizado no segundo lote poderiam ser os motivos para a maior produção de putrescina, cadaverina e histamina em bacalhau e hadoque no experimento 2.

Os conteúdos de putrescina e cadaverina têm sido propostos como indicadores de frescor para diversas espécies de pescado (YAMANAKA, 1989; FERNÁNDEZ-SALGUERO & MACKIE, 1987) uma vez que estas aminas são as mais freqüentemente encontradas durante a decomposição de pescados. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam a predominância de cadaverina e putrescina no músculo de bacalhau e hadoque durante o armazenamento. Além disso, do mesmo modo como relataram BAIXAS-NOGUERAS et al. (2002), embora os níveis de cadaverina tenham aumentado mais tardiamente que os de putrescina, ao final da estocagem eles foram geralmente maiores.



**Tabela 3.1. Teores de aminas biogênicas em bacalhau (*Gadus morhua*) durante o armazenamento em gelo (0 - 1°C).**

Armazenamento (dias)	AMINAS BIOGÊNICAS {mg/100g (DP)}							
	AGMATINA		CADAVERINA		PUTRESCINA		HISTAMINA	ESPERMINA
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 2	Experimento 2
1	8,503 <sup>b</sup> (0,386)	3,582 <sup>a</sup> (1,032)	0,902 <sup>a</sup> (0,054)	nd	0,283 <sup>a</sup> (0,007)	traços	nd	nd
7	9,699 <sup>ab</sup> (0,161)	3,715 <sup>a</sup> (2,543)	0,897 <sup>a</sup> (0,007)	nd	0,260 <sup>a</sup> (0,003)	0,242 <sup>a</sup> (0,141)	nd	nd
11	ND	2,315 <sup>a</sup> (0,831)	ND	0,991 <sup>a</sup> (0,075)	ND	0,406 <sup>a</sup> (0,010)	nd	nd
13	9,699 <sup>ab</sup> (1,407)	0,718 <sup>a</sup> (0,652)	0,755 <sup>ab</sup> (0,150)	1,564 <sup>a</sup> (0,097)	0,428 <sup>a</sup> (0,192)	0,773 <sup>b</sup> (0,102)	nd	nd
15	ND	1,225 <sup>a</sup> (0,458)	ND	4,867 <sup>b</sup> (0,349)	ND	1,355 <sup>c</sup> (0,266)	nd	nd
19	10,821 <sup>a</sup> (0,432)	0,857 <sup>a</sup> (0,467)	0,559 <sup>b</sup> (0,039)	7,575 <sup>c</sup> (0,135)	1,615 <sup>b</sup> (0,100)	1,945 <sup>d</sup> (0,022)	1,333 <sup>a</sup> (0,300)	nd
25	ND	0,746 <sup>a</sup> (0,439)	ND	11,382 <sup>d</sup> (0,340)	ND	2,327 <sup>e</sup> (0,054)	7,192 <sup>b</sup> (0,942)	traços

DP = desvio padrão da média

ND = não determinado

nd = não detectado

<sup>a,b,c,...</sup> Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente (p<0,05)

**Tabela 3.2. Teores de aminas biogênicas em hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*) durante o armazenamento em gelo (0 - 1°C).**

Armazenamento (dias)	AMINAS BIOGÊNICAS {mg/100g (DP)}											
	AGMATINA		CADAVERINA		PUTRESCINA		HISTAMINA		ESPERMINA		ESPERMIDINA	TIRAMINA
	Experimento		Experimento		Experimento		Experimento		Experimento		Experimento	Experimento
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
1	8,814 <sup>a</sup> (0,922)	1,175 <sup>b</sup> (0,204)	1,092 <sup>a</sup> (0,099)	nd	traços	traços	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	9,700 <sup>a</sup> (1,212)	1,576 <sup>ab</sup> (0,152)	1,456 <sup>a</sup> (0,377)	nd	0,385 <sup>a</sup> (0,423)	traços	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	ND	2,351 <sup>a</sup> (0,254)	ND	0,584 <sup>a</sup> (0,036)	ND	0,779 <sup>a</sup> (0,045)	ND	nd	ND	nd	nd	nd
13	11,194 <sup>a</sup> (1,309)	2,435 <sup>a</sup> (0,257)	2,005 <sup>b</sup> (0,081)	0,572 <sup>a</sup> (0,065)	1,007 <sup>b</sup> (0,081)	1,381 <sup>b</sup> (0,070)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	ND	1,245 <sup>b</sup> (0,082)	ND	3,106 <sup>b</sup> (0,373)	ND	2,966 <sup>c</sup> (0,144)	ND	1,293 <sup>a</sup> (0,091)	ND	traços	nd	nd
19	10,137 <sup>a</sup> (0,899)	1,872 <sup>ab</sup> (0,646)	4,468 <sup>c</sup> (0,060)	6,427 <sup>c</sup> (0,441)	1,457 <sup>b</sup> (0,028)	3,010 <sup>c</sup> (0,079)	0,912 (0,083)	2,571 <sup>b</sup> (0,320)	nd	traços	0,660 <sup>a</sup> (0,072)	nd
25	ND	1,795 <sup>ab</sup> (0,665)	ND	6,411 <sup>c</sup> (0,642)	ND	4,324 <sup>d</sup> (0,119)	ND	5,346 <sup>c</sup> (0,150)	1,183 (0,191)	traços	0,696 <sup>a</sup> (0,046)	1,600 (0,116)

DP = desvio padrão da média

ND = não determinado

nd = não detectado

<sup>a,b,c,...</sup> Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente (p<0,05)

Os resultados indicam, contudo, que putrescina e cadaverina seriam mais adequadas como índices de deterioração que de frescor para *G. morhua* e *M. aeglefinus*, e confirmam os relatados por FERNÁNDEZ-SALGUERO & MACKIE (1987) para *G. morhua*, onde cadaverina, putrescina e histamina também foram as principais aminas biogênicas encontradas. Os autores concluíram que putrescina e cadaverina são potencialmente úteis como índices de baixa qualidade em *G. morhua*, pois aumentaram regularmente somente após o início da deterioração bacteriana. Em contraste, HERNÁNDEZ-HERRERO et al. (2002) avaliaram os teores de PUT, CAD, HIS, SPM, SPD e TYR durante o armazenamento de *G. morhua* em gelo por 9 dias e não observaram aumentos progressivos destes compostos.

BAIXAS-NOGUERAS et al. (2002) citam o *Diário Oficial de las Comunidades Europeas* que estabeleceu em 1991 o limite de 100mg de histamina/kg para produtos frescos ou enlatados. Nos Estados Unidos, o Food and Drug Administration (FDA) reduziu o limite de segurança para histamina de 100 para 50mg/kg e recomendou que não apenas histamina, mas também o teor de outras aminas biogênicas seja levado em consideração (FDA, 1995). A Comunidade Européia tem sugerido que o limite máximo para o teor total de aminas biogênicas seja 300ppm (300mg/kg) em pescado e produtos de pescado (PERIAGO et al., 2003). No presente estudo os teores mais elevados de histamina encontrados foram 7,19mg/100g em bacalhau e 5,35mg/100g em hadoque após 25 dias de armazenamento. O teor total de aminas biogênicas acumulado em *G. morhua* foi de, no máximo, 21,9mg/100g de músculo e em *M. aeglefinus* 18,3mg/100g após 25 dias de armazenamento em gelo. Tais resultados indicam que estas espécies de pescado podem acumular histamina em níveis próximos ou até mesmo superiores aos limites de segurança após um período prolongado de armazenamento em gelo.

Os teores de putrescina, cadaverina, histamina, espermina e espermidina foram combinados no índice QI (MIETZ & KARMAS, 1978) e os resultados estão apresentados na **Figura 3.3**.

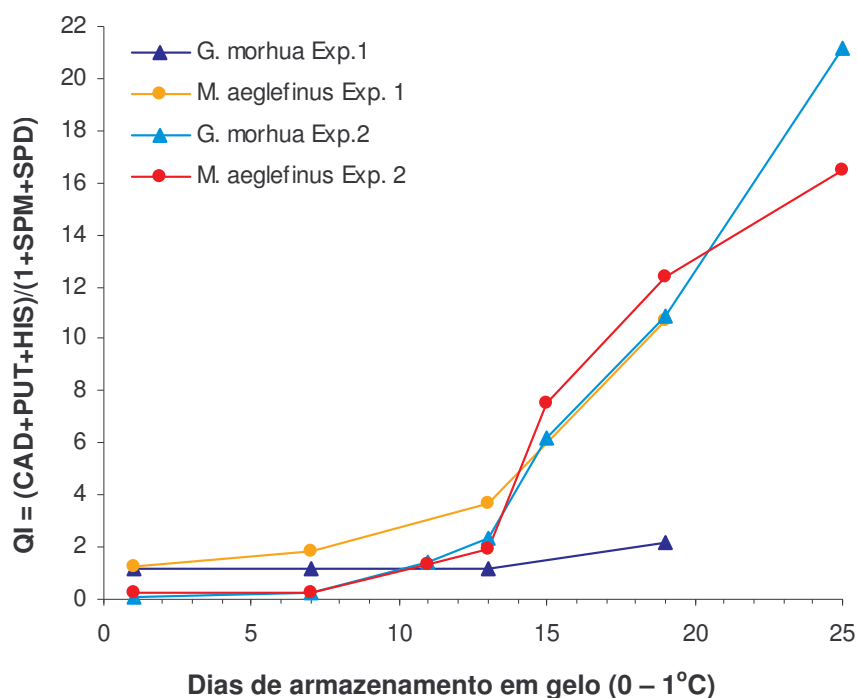


Figura 3.3. QI (Índice de Qualidade definido por Mietz & Karmas, 1977) em bacalhau (*Gadus morhua*) e hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*) durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C).

Verificou-se que os valores de QI aumentaram rapidamente após o 7º dia de armazenamento para *M. aeglefinus* e *G. morhua* no experimento 2 e apenas para *M. aeglefinus* no experimento 1. HERNÁNDEZ-HERRERO et al. (2002) utilizaram o QI para *G. morhua* e concluíram que ele não era um bom índice de qualidade, pois não foi detectada diferença significativa entre os QI de peixes com qualidade sensorial aceitável, no início da decomposição e em decomposição avançada.

### 3.3.3. Bases nitrogenadas voláteis (BNV), trimetilamina (TMA) e óxido de trimetilamina (O-TMA)

O teor inicial de BNV em filés de bacalhau (*G. morhua*) no experimento 1 (8,84mg/100g) foi menor ( $p < 0,05$ ) que o detectado nos filés do experimento 2 (12,40mg/100g). Os teores iniciais de N-TMA, 0,19 e 0,82mg/100g nos

experimento 1 e 2, respectivamente, não diferiram ( $p < 0,05$ ). Em hadoque, o teor inicial de BNV no experimento 1 (7,30mg/100g) também foi menor ( $p < 0,05$ ) que o detectado nos filés no experimento 2 (11,00mg/100g). Os teores iniciais de N-TMA, 0,39 e 0,52mg/100g nos experimentos 1 e 2, respectivamente também não diferiram ( $p < 0,05$ ).

De acordo com CONNELL & SHEWAN (1980) e HUSS (1988) apud DEBEVERE & BOSKOU (1996) *G. morhua* fresco normalmente apresenta menos que 20mg de BNV/100g e 3mg N-TMA/100g de músculo. DEBEVERE & BOSKOU (1996) detectaram ao redor 8mg de BNV e 1mg de TMA por 100g de *G. morhua* (dados apresentados em gráfico pelos autores). FERNANDEZ-SALGUERO & MACKIE (1987) detectaram 0,45mg de TMA/100g em *M. aeglefinus*. Em merluza (*M. merluccius*), outro peixe da ordem *Gadiforme* foram determinados 0,29mg de TMA e 10,92mg de BNV por 100g de músculo (RUIZ CAPILAS & MORAL, 2001A).

As concentrações de BNV e N-TMA encontradas em filés de bacalhau e hadoque neste estudo são similares aos publicados na literatura e indicam que se tratavam de pescados frescos. No entanto, os valores mais altos de BNV nos peixes utilizados no experimento 2 confirmam os resultados das análises de putrescina e cadaverina e indicam que o grau de frescor dos peixes utilizados no segundo experimento era menor.

Em relação ao padrão de produção de BNV e TMA, aumentos mais acentuados ocorreram apenas após o 7º dia, tanto em bacalhau (**Figura 3.4**) quanto em hadoque (**Figura 3.5**).

Em bacalhau, foram determinados teores de BNV, TMA e O-TMA geralmente menores nos filés dos peixes do experimento 1 que nos do experimento 2 (**Figura 3.4**). No experimento 1, houve um aumento ( $p < 0,05$ ) progressivo dos teores de BNV e TMA nos filés desde o início do armazenamento, enquanto no experimento 2 apenas após o dia 7.

Em hadoque, ao contrário, foram determinados teores de BNV, TMA e O-TMA geralmente maiores nos filés dos peixes do experimento 1 que nos do experimento 2 (**Figura 3.5**). No experimento 1, houve um aumento ( $p < 0,05$ )

progressivo dos teores de BNV e TMA nos filés desde o início do armazenamento, enquanto no experimento 2 apenas após o dia 7.

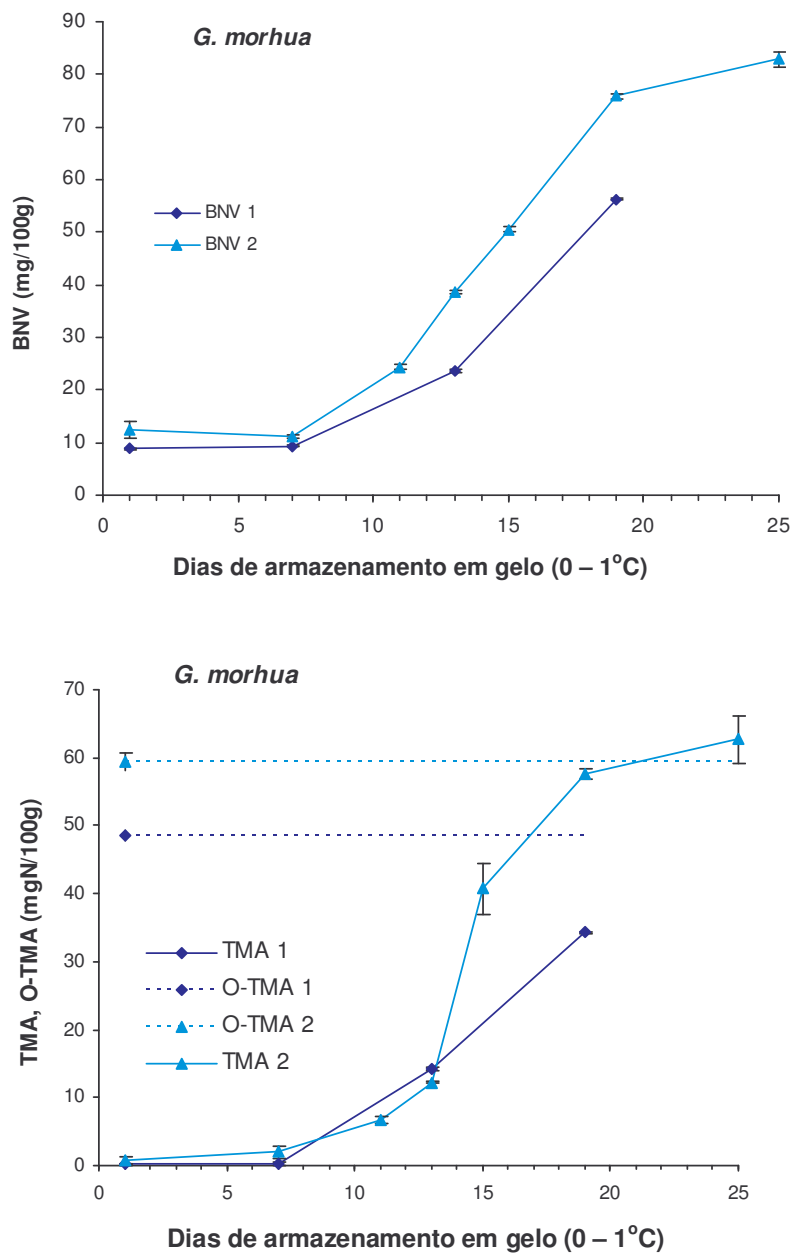


Figura 3.4. Teores de BNV, TMA e O-TMA em músculo de *Gadus morhua* durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C). As barras verticais indicam o desvio padrão da média.

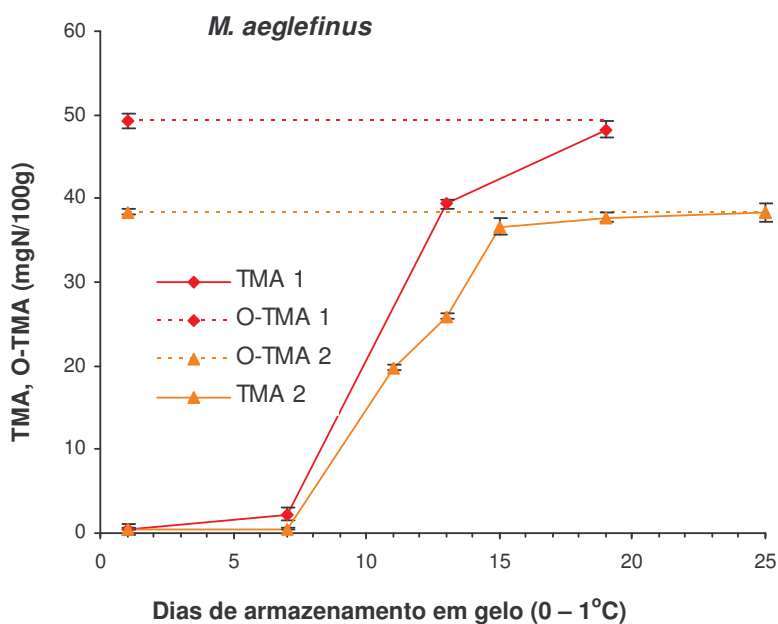
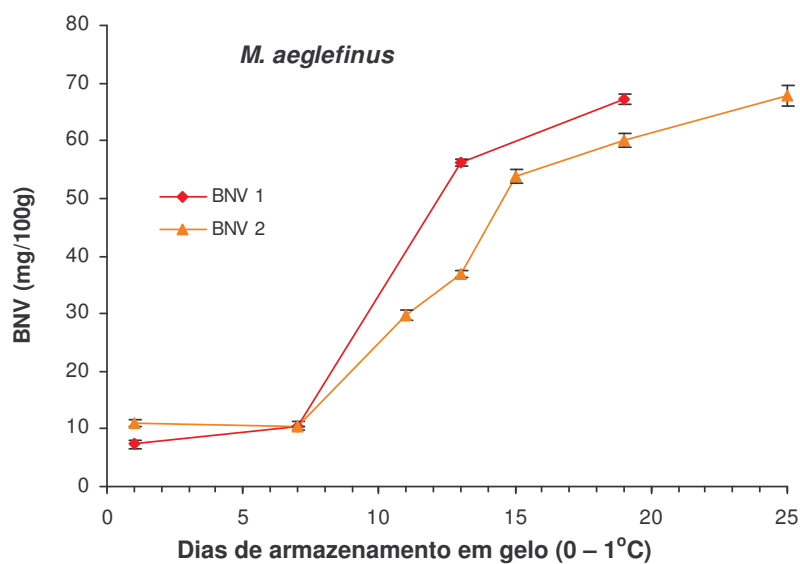


Figura 3.5. Teores de BNV, TMA e O-TMA em músculo de *Melanogrammus aeglefinus* durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C). As barras verticais indicam o desvio padrão da média.

Os coeficientes de correlação entre BNV e TMA foram  $r=0,99$  e  $r=0,97$  nos experimentos 1 e 2, respectivamente, para as duas espécies de pescado.

Um bom índice de frescor deve apresentar aumento ou diminuição progressiva e significativa de concentração durante os primeiros dias de armazenamento. As alterações na concentração de BNV e TMA em bacalhau e hadoque foram pequenas durante a primeira semana, e aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) foram observados em apenas um dos experimentos, o que confirma os resultados contraditórios encontrados na literatura quanto à utilização e limitações destas determinações químicas como índices de frescor. DHANANJAYA & STROUD (1994) relataram que o aumento de BNV foi progressivo durante o armazenamento de hadoque (*M. aeglefinus*). FERNÁNDEZ-SALGUERO & MACKIE (1987) reportaram um aumento progressivo de TMA em hadoque inteiro ou em filés armazenados em gelo e concluíram que este composto é útil como índice de frescor. HERNÁNDEZ-HERRERO et al. (2002) não observaram diferenças significativas nos teores de BNV durante o armazenamento de bacalhau por 9 dias em gelo, enquanto os teores de TMA aumentaram após o terceiro dia. Os autores concluíram que TMA poderia ser útil apenas como indicador do processo de putrefação.

BOTTA et al. (1984) avaliaram seis metodologias diferentes para determinação de BNV em bacalhau (*G. morhua*) e observaram que, independentemente do método, houve um aumento de BNV durante o armazenamento, particularmente após 9-11 dias. O padrão de produção observado utilizando-se os seis métodos foi semelhante, porém, em alguns casos, as diferenças nos teores de BNV determinados foram grandes. O método utilizado no presente estudo foi considerado um dos melhores em relação à recuperação de BNV. As diferenças nos teores de BNV encontradas em diversos estudos, para uma mesma espécie, podem ser causadas por diferenças nas metodologias empregadas.

O RIISPOA – BRASIL (1980) e a Portaria 185 de 1997 da Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA, 1997) estabelecem 30mg de BNV/100g de músculo de pescado como valor limite para comercialização. A Comunidade Européia (EC) estabelece valores limites de 35mg de BNV e 12mg de TMA por 100g de músculo através das diretivas 95/149/EEC e 91/493/EEC, respectivamente (RUIZ CAPILAS & MORAL, 2001A, 2001B). Considerando-se os limites recomendados pela EC, os



valores limites de TMA foram atingidos ao redor do dia 13 para bacalhau nos dois experimentos, e para o hadoque antes do dia 13 e antes do dia 11, nos experimentos 1 e 2 respectivamente. Os valores limites de BNV foram atingidos antes do dia 19 no experimento 1 e antes do dia 13 no experimento 2 para bacalhau e depois do dia 7 e perto do 13 para hadoque nos experimentos 1 e 2, respectivamente. Tais resultados indicam que estas espécies mantêm uma qualidade aceitável por um período de no mínimo 7 e de no máximo 13 dias quando armazenadas em gelo.

Através de análise sensorial, JØRGENSEN et al. (1988) determinaram, em cinco experimentos diferentes, uma vida útil entre 10 e 16 dias para *G. morhua* eviscerado armazenado em gelo. A vida de prateleira estava direta e negativamente correlacionada com a qualidade bacteriológica inicial. Em todos os casos os teores de BNV e TMA estavam abaixo dos limites de 35 e 12mg/100g, respectivamente, quando os peixes foram rejeitados sensorialmente.

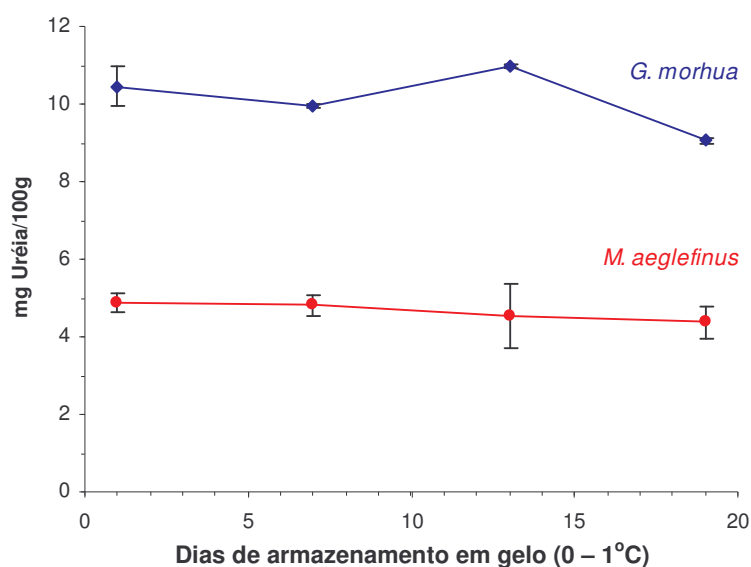
Em um experimento conduzido por HUSS et al. (1974), *G. morhua* mantido em gelo foi rejeitado sensorialmente após 12 dias de armazenamento, quando o teor de BNV era 25mg/100g de músculo. DHANANJAYA & STROUD (1994) encontraram valores superiores a 35mg de BNV/100g em *Melanogrammus aeglefinus* após 5 dias de armazenamento a 0°C para peixes inteiros, e após 6,3 dias para filés. No entanto, o teor de BNV no início do experimento, em torno de 20mg/100g, era bastante superior ao encontrado no presente estudo.

ZHANGA et al. (2003) determinaram cerca de 11,6mg de TMA/100g de hadoque após 15 dias de armazenamento em gelo. FERNÁNDEZ-SALGUERO & MACKIE (1987) reportaram um aumento progressivo de TMA em hadoque inteiro ou em filés armazenados em gelo e concluíram que este composto é útil como índice de frescor. O valor limite de 12mg de TMA/100g foi atingido entre os dias 8 e 10, e após um período de aumento bastante acentuado, ocorreu uma estabilização entre 43,47 e 41,47mg/100g nos dias 14 e 16, para hadoque inteiro e filés, respectivamente. Esta desaceleração da produção de TMA também foi observada no presente estudo e pode ser explicada pelo esgotamento do substrato O-TMA.

Na **Figura 3.5** observa-se que em hadoque, todo o O-TMA já havia sido reduzido a TMA após 19 dias de armazenamento nos dois experimentos e em bacalhau o mesmo ocorreu no experimento 2 (**Figura 3.4**).

### 3.3.4. Uréia

Os teores de uréia em filés de bacalhau (*G. morhua*) e hadoque (*M. aeglefinus*) armazenados em gelo foram determinados apenas no experimento 1 (**Figura 3.6**). Verificou-se que em *G. morhua* os teores de uréia variaram entre 9 e 11mg/100g sem que fosse observada uma tendência de aumento ou diminuição contínua. Em hadoque foi observada uma tendência de diminuição dos valores de uréia durante o armazenamento, porém as diferenças não foram significativas. Não foram encontrados estudos publicados sobre a utilização de uréia como índice de qualidade ou frescor em peixes e os resultados do presente estudo indicam que uréia não apresenta potencial para utilização com índice de frescor para as espécies *G. morhua* e *M. aeglefinus*.



**Figura 3.6.** Teores de uréia em bacalhau (*G. morhua*) e hadoque (*M. aeglefinus*) durante o armazenamento em gelo (0 – 1°C). As barras verticais indicam o desvio padrão da média.

### 3.4. CONCLUSÕES

Dentre as aminas biogênicas estudadas, cadaverina e putrescina foram as que apresentaram maiores aumentos em seus teores durante o armazenamento, porém as alterações durante a primeira semana de armazenamento não foram significativas ( $p < 0,05$ ).

Bases nitrogenadas voláteis e trimetilamina não foram consideradas índices de frescor adequados para bacalhau (*Gadus morhua*) e hadoque (*Melanogrammus aeglefinus*), uma vez que alterações significativas ( $p < 0,05$ ) de seus teores durante a primeira semana de armazenamento ocorreram em apenas um experimento.

O padrão de produção mais acentuado a partir da segunda semana de armazenamento, caracteriza as aminas voláteis e aminas biogênicas como indicadores de deterioração para *Gadus morhua* e *Melanogrammus aeglefinus*.

Os teores de histamina determinados em *Gadus morhua* e *Melanogrammus aeglefinus* indicaram que estas espécies de pescado podem acumular esta amina em níveis próximos ou até mesmo superiores aos limites de segurança após um período prolongado de armazenamento em gelo.

Uréia se mostrou inadequada como índice de qualidade para as duas espécies de peixes estudadas, uma vez que não apresentou um padrão de aumento ou diminuição significativo durante o armazenamento.

Em comparação com resultados publicados na literatura, os teores de BNV e TMA determinados indicaram uma vida útil entre 7 e 13 dias para *G. morhua* e *M. aeglefinus* armazenados em gelo. No entanto, para determinar valores limites de cadaverina, putrescina, BNV ou TMA acima dos quais *G. morhua* e *M. aeglefinus* seriam considerados inadequados para consumo, é necessário estudar simultaneamente as alterações em parâmetros sensoriais e microbiológicos para verificar a existência de correlações entre o aumento dos teores de aminas voláteis e não voláteis (biogênicas), a perda da qualidade sensorial e o desenvolvimento de bactérias deterioradoras.

### 3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANAJÁS, P. P. **Determinação dos compostos básicos totais do pescado e o seu potencial para avaliação do frescor**. Campinas: UNICAMP, 1985. 110p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 1985.
- ASHIE, I. N. A.; SMITH, J. P. ;SIMPSON, B. K. Spoilage and shelf-life extention of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 36, n. ½, p. 87-121, 1996.
- BAIXAS-NOGUERAS, S.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, T.; VIDAL-CAROU, M.C. Chemical and sensory changes in mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6 – 8°C) and stored in ice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 6504-6510, 2002.
- BOTTA, J. R.; LAUDER, J. T.; JEWER, M. A. Effect of methodology on total volatile basic nitrogen (TVB-N) determination as an index of quality of fresh Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Journal of Food Science**, v. 49, n. 3, p. 734-736, 1984.
- CIVERA, T.; TURI, R. M.; PARISI, E.; FAZIO, G. Further investigations on total volatile basic nitrogen and trimethylamine in some Mediterranean teleosteans during cold storage. **Sciences des Aliments**, v. 15, n. 2, p. 179-186, 1995.
- DHANANJAYA, S. & STROUD, G. D. Chemical and sensory changes in haddock and herring stored under modified atmosphere. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 29, p. 575-583, 1994.
- DEBEVERE, J. ; BOSKOU, G. Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 221-229, 1996.
- DYER, W. J. Amines in fish muscle. 1. Colorimetric determination of TMA as picrat salt. **Journal of the Fisheries Research Board Canada**, v.6, p.351-358, 1945.
- FDA. Decomposition and histamine – Raw, frozen tuna and Mahi-mahi, canned tuna, and related species. Revised compliance guide, Availability. **Federal Register**, v. 149, p. 39754-39756, 1995.
- FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. & MACKIE, I.M. Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and herring (*Clupea harengus*) as determined by the formation of non-volatile and volatile amines. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 22, p. 385-390, 1987.

- GATHWAITE, G. A. Chilling and freezing of fish. In: G. M. HALL. **Fish Processing Technology**. New York: VCH Publishers Inc., 1992.
- GIL, T. A.; THOMSON, J. W.; GOULD, S.; SHERWOOD, D. Characterization of quality deterioration in yellow fin tuna. **Journal of Food Science**, v. 52, p.580-583, 1987.
- HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M.; DUFLOS, G.; MALLE, P. & BOUQUELET, S. Amino acid decarboxylase activity and other chemical characteristics as related to freshness loss in iced cod (*Gadus morhua*). **Journal of Food Protection**, v.65, n.7, p.1152-1157, 2002.
- HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 13<sup>o</sup> ed., Washington D.C., A.O.A.C. 1980.
- HOWGATE, P. Determination of total volatile bases. **Torry Research Station**. Aberdeen, TD 564, Appendix 4, 1976.
- HUSS, H. H.; DALSGAARD, D.; HANSEN, L.; LADEFOGED, H; PEDERSEN, A.; ZITTAN, L. The influence of hygiene in catch handling on the storage life of iced cod and plaice. **Journal of Food Technology**, v. 9, p. 213-221, 1974.
- JØRGENSEN, B. R.; GIBSON, D. M.; HUSS, H. H. Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 295-307, 1988.
- MAPA/SDA Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento / Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria 185, 1997. Disponível em: <http://paginas.terra.com.br/educacao/seafoodgroup/legisla.htm>. Acesso em: 6 maio 2005.
- MAZORRA-MANZANO, M. A.; ACHECO-AGUILAR, R. P.; ÍAZ-ROJAS, E. I. D.; UGO-SÁNCHEZ, M. E. L. Post mortem changes in black skipjack muscle during storage in ice. **Food Chemistry and Toxicology**, v.65, n. 5, p.774-779, 2000.
- MIETZ, J. L. & KARMAS, E. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Food Science**, v.42, n.1, p.155-158, 1977.
- MIETZ, J. L.; KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. **Journal of the Association of Official Analysts Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 139-145, 1978.
- 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. **Journal of Food and Technology**, v.7, n.1, p.35-46, 1972.
- PERIAGO, M. J.; RODRIGO, J.; ROS, G.; RODRÍGUEZ-JÉREZ, J. J.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M. Monitoring volatile and nonvolatile amines in dried and salted roes of tuna (*Thunnus*

- thynnus* L.) during manufacture and storage. **Journal of Food Protection**, v.66, n.2, p.335-340, 2003.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, E. Correlation between biochemical and sensory quality indices in hake stored in ice. **Food Research International**, v. 34, p. 441-447, 2001A.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, E. Chilled bulk storage of gutted hake (*Merluccius merluccius* L.) in CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> enriched controlled atmospheres. **Food Chemistry**, v. 74 p. 317–325, 2001B.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, E. Effect of controlled and modified atmospheres on the production of biogenic amines and free amino acids during storage of hake. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 476-481, 2002.
- SMITH, T.A. Amines in food. **Food Chemistry**, v.6, n.3, p.169-200, 1980-81.
- ZHANGA, Y.; LUA, H.; LEVIN, R. E. Enhanced storage-life of fresh haddock fillets with stabilized sodium chlorite in ice. **Food Microbiology**, v. 20, p. 87–90, 2003.

## **CAPÍTULO 4. TEORES DE AMINAS BIOGÊNICAS, BASES NITROGENADAS VOLÁTEIS, TRIMETILAMINA, URÉIA E TRIPTOFANO LIVRE EM CEFALÓPODES (*Sepia officinalis* E *Illex coindetii*) DURANTE O ARMAZENAMENTO EM GELO**

### **RESUMO**

Polvos, sépias e lulas, invertebrados da classe cefalópode, têm sido considerados um dos mais promissores recursos para aumentar a captura de animais marinhos não criados. Cefalópodes, como o pescado de modo geral, possuem uma vida útil muito curta, sendo importante dispor de métodos eficientes para a avaliação do frescor. As determinações de bases nitrogenadas voláteis (BNV), trimetilamina (TMA), aminas biogênicas, uréia e triptofano livre têm sido avaliadas para algumas espécies, porém, um índice de frescor confiável para cefalópodes ainda não foi estabelecido. A lixiviação de compostos solúveis do músculo durante o armazenamento em gelo é um dos fatores que podem inviabilizar a utilização de índices de frescor para espécies de cefalópodes. Os objetivos deste trabalho foram estudar o padrão de produção de aminas biogênicas, BNV, TMA, triptofano livre e uréia em lulas (*Illex coindetii*) e sépias (*Sepia officinalis*) armazenadas em gelo e avaliar o potencial destes compostos como índices de frescor, verificando se o efeito da lixiviação pode ser minimizado pela expressão dos teores destes compostos como % do nitrogênio não protéico (NNP). Lulas e sépias foram armazenadas em gelo e amostradas após 1, 4, 8, 11 e 14 dias. Os teores dos diversos compostos foram determinados em extratos do músculo desproteinizados com ácido tricloroacético. Modelos de regressão linear e quadrática indicaram um aumento progressivo dos teores da amina biogênica agmatina em *Illex coindetii* e de BNV, triptofano livre e uréia nas duas espécies de cefalópodes desde o início do armazenamento. BNV e triptofano livre foram considerados bons índices de frescor para *I. coindetii* e *S. officinalis*, pois seus teores aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) durante a primeira semana de armazenamento. Agmatina e uréia foram consideradas índices de deterioração para *I. coindetii* e *S. officinalis*, respectivamente. A produção de TMA foi exponencial nas duas espécies de cefalópodes. Foi detectado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos teores de TMA expressos como % do NNP durante a primeira semana de armazenamento em *I. coindetii* que sugere sua utilidade como índice de frescor para lula. Para *S. officinalis* TMA é mais indicada como índice de deterioração. Foi observada uma diminuição significativa do NNP no músculo das duas espécies durante o armazenamento, o que comprova a existência de lixiviação. O efeito da lixiviação, que dificulta o acúmulo dos compostos solúveis no músculo, e diminui a utilidade de alguns índices de frescor, foi minimizado quando os teores dos diversos compostos foram expressos como % do NNP.

## SUMMARY

Octopuses, cuttlefishes and squids, invertebrates that belong to Cephalopod Class, have been considered one of the most important resources for increasing the catch of marine animals. Cephalopods present a short shelf life and useful chemical indices for freshness evaluation are greatly necessary. Total volatile bases-nitrogen (TVB-N), trimethylamine (TMA), biogenic amines, urea and free tryptophan have been evaluated as freshness indices for some squid species; however, a reliable freshness index for cephalopods has not been established yet. The storage in ice can cause the leaching of soluble compounds from the muscle drastically affecting the efficiency of some chemical indices for freshness. The objectives of this study were to investigate the pattern of production of biogenic amines, TVB-N, TMA, urea and free tryptophan in squid (*Illex coindetii*) and cuttlefish (*Sepia officinalis*) stored in ice and to evaluate the usefulness of these compounds as freshness indices. The contents of agmatine, TVB-N, TMA, tryptophan and urea were calculated as mg/100g of muscle and as % of non-protein nitrogen (NPN) as an attempt to minimize the leaching effect by calculating the amount of one compound as a proportion of another compound that simultaneously varies. Squids and cuttlefishes were stored between ice layers and sampled after 1, 4, 8, 11 and 14 days of storage. The levels of the compounds were determined in muscle extracts in which the proteins had been precipitated with trichloroacetic acid. Linear and quadratic regression models indicated a progressive increase of TVB-N, free tryptophan and urea in *S. officinalis* and *I. coindetii* during the whole storage, besides a progressive increase of the biogenic amine agmatine in *I. coindetii*. TVB-N and free tryptophan were considered good freshness indices for both cephalopod species, because their levels significantly increased ( $p > 0.05$ ) during the first week of storage. Agmatine and urea were useful as spoilage indices for *I. coindetii* and *S. officinalis*, respectively. The TMA contents exponentially increased in both species of cephalopods. It was observed a significant increase of TMA (% of NPN) during the first week of storage in *I. coindetii* indicating the TMA usefulness as freshness index for squid. For *S. officinalis* TMA was a good spoilage index. A significant decrease of NPN during storage was observed in both cephalopod species, as a consequence of the leaching effect. The leaching effect was minimized by calculating the compound amounts as % of NPN.



#### 4.1. INTRODUÇÃO

Polvos, sépias e lulas, invertebrados da classe cefalópode, têm sido considerados um dos mais promissores recursos marinhos para aumentar a captura de animais marinhos não criados (GUERRA, 1991) devido a sua abundância e ao ciclo biológico de curta duração, que garante uma rápida renovação dos estoques (GUERRA, 1996). A demanda mundial por cefalópodes cresceu a uma taxa de 15% ao ano entre 1994 e 1996, um índice maior que o relatado para peixes marinhos, indicando uma demanda específica por estes animais (GUERRA, 1996). No entanto, cefalópodes constituem apenas 1,3 a 1,8% dos produtos marinhos coletados mundialmente (COLLIGNAN & MONTET, 1998). A captura mundial total foi superior a 3,3 milhões de toneladas entre 1999 e 2001 (FAO, 2001). Como consequência do aumento da captura, o número de novos consumidores também tem crescido, tanto nos países sem tradição de consumo de cefalópodes, quanto naqueles onde o consumo já era tradicional (MELENDO et al., 1997). Eles são elementos comuns em dietas no Oriente, principalmente no Japão, e no Mediterrâneo, porém, recentemente, seu consumo tem também aumentado na América (RUIZ-CAPILLAS et al., 2002).

*Illex coindetii* é uma espécie de lula bastante explorada comercialmente. Na Espanha, por exemplo, é uma das espécies de maior valor comercial e importância econômica (RUIZ-CAPILLAS et al., 2002). Cerca de 50 a 90 toneladas desta espécie são capturadas anualmente e uma de suas características é a textura dura do manto que dificulta a aceitação pelo consumidor (COLLIGNAN & MONTET, 1998). A espécie tem sido estudada quanto às propriedades funcionais do músculo (RUIZ-CAPILLAS et al., 2002A), métodos para amaciar o músculo (COLLIGNAN & MONTET, 1998, MELENDO, et al., 1997), caracterização do nitrogênio não protéico (RUIZ-CAPILLAS, et al. 2002B). *Sepia officinalis* é um dos cefalópodes que apresenta maior potencial para cultivo, devido ao ciclo de vida curto, ausência de fase larvária, crescimento rápido e adaptação a condições de

cativeiro (GUERRA, 1996). VILLANUEVA et al. (2004) citam alguns estudos sobre o desenvolvimento de ração para *Sepia officinalis*.

Frescor é um dos mais importantes fatores de qualidade para produtos de origem marinha. Pescados marinhos são normalmente transportados em gelo do local de captura até os portos e durante este transporte mudanças nos constituintes químicos do tecido muscular começam a ocorrer. Muitos métodos químicos para avaliação do frescor em peixes, crustáceos e moluscos estão baseados em mudanças dos componentes da fração nitrogenada não protéica do músculo, tais como bases nitrogenadas voláteis (BNV) e trimetilamina (TMA) (LAPA-GUIMARÃES et al., 2005). Limites de aceitabilidade para os teores de TMA e BNV têm sido propostos para algumas espécies de lulas. KE et al., (1984) sugeriram limites de 30mg de BNV e 3mg de TMA/100g para lulas da espécie *Illex illecebrosus* de qualidade A, valores entre 30 e 45mg de BNV e entre 3 e 10mg de TMA/100g para lulas com qualidade B e qualidade inaceitável para lulas com teores acima de 45mg de BNV e 10mg de TMA/100g. Outros estudos (ROMO et al., 1996; CIVERA, et al., 1999; PAARUP et al., 2002) têm mostrado que limites de aceitabilidade são dependentes da espécie e condições de armazenamento, sendo, portanto, muito variáveis. As determinações de triptofano livre (ROMO et al., 1996; LAPA-GUIMARÃES et al., 2005) e de uréia (ROMO et al., 1996; OTSUKA et al., 1992; LAPA-GUIMARÃES et al., 2005) têm sido avaliadas para espécies de lulas, mostrando resultados promissores.

A aplicabilidade das aminas biogênicas como índice de frescor também tem sido estudada em algumas espécies de lulas. Em *Todaropsis eblanae*, putrescina, agmatina e cadaverina aumentaram de níveis próximos a 0 para cerca de 180, 130 e 60mg/100g, respectivamente, após 7 dias de armazenamento a 4°C (PAARUP et al., 2002). Em dois diferentes estudos com *Todarodes pacificus*, os resultados quanto à utilidade das aminas biogênicas foi contraditório. Agmatina foi considerada o melhor índice para avaliação do frescor, em comparação com outras aminas biogênicas e com BNV por YAMANAKA et al. (1987), enquanto OHASHI et al. (1991) concluíram que poliaminas não são bons indicadores de frescor.

Cefalópodes, assim como a maioria do pescado consumido fresco, são armazenados entre camadas de gelo triturado durante transporte e comercialização. Assim, o processo de deterioração ocorre entre 0 e 1°C com contínuo derretimento de gelo, que pode causar lixiviação de compostos solúveis do músculo. Nesta condição de armazenamento, um aumento na concentração de um composto solúvel no músculo somente será detectado quando a velocidade de sua formação superar a velocidade de perda. Este fenômeno pode causar uma diminuição da eficiência de muitas determinações químicas para avaliação do frescor. A lixiviação foi estudada em espécies de camarão por COBB III et al. (1973), que observaram perda de qualidade e inviabilização de algumas determinações analíticas para avaliação do frescor. Em um trabalho posterior, COBB III et al. (1976) propuseram um novo índice que relacionava o teor de BNV com o teor de aminoácidos livres para eliminar a influência da lixiviação. De acordo com CONTRERAS (1994) expressar os resultados de uma determinação química como quocientes de um parâmetro que varia simultaneamente com ela, diminui ou elimina o efeito da lixiviação. O mesmo autor sugere que os teores de TMA e BNV poderiam ser expressos como % do nitrogênio não protéico (NNP) para tornar estas determinações mais úteis como índices de deterioração de pescado de tamanho pequeno conservado em gelo.

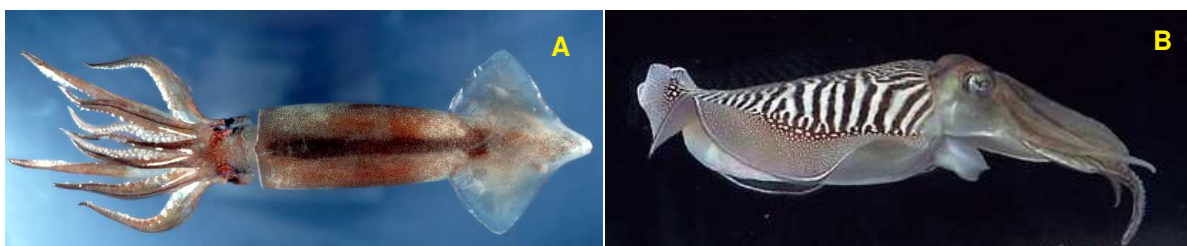
Os objetivos deste estudo foram:

1. Estudar o padrão de formação de aminas biogênicas, BNV, TMA, triptofano livre e uréia em lulas da espécie *Illex coindetii* e sépias da espécie *Sepia officinalis* armazenadas em gelo.
2. Estudar o potencial destes compostos como índices de frescor ou deterioração para as espécies de lula e sépia e avaliar se o efeito da lixiviação pode ser minimizado pela expressão dos teores destes compostos como % do NNP.

## 4.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Espécies, condições de armazenamento e amostragem

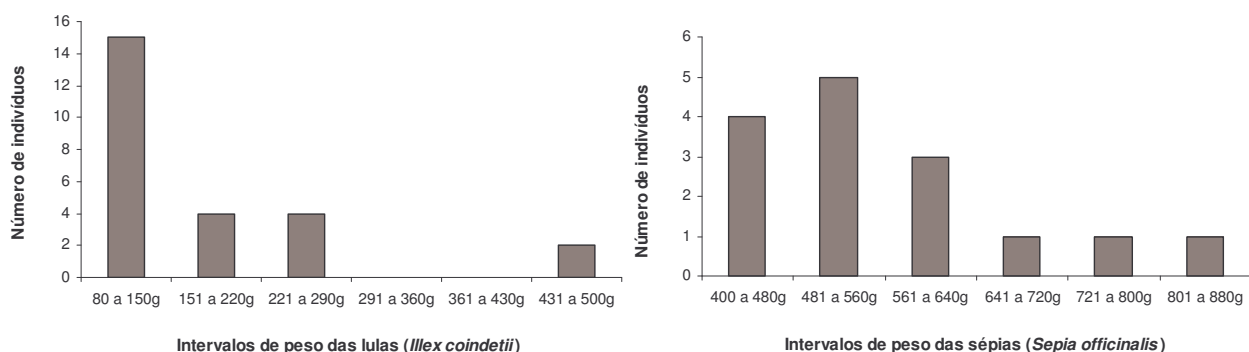
Lulas da espécie *Illex coindetii* e sépias da espécie *Sepia officinalis* (**Figura 4.1**) foram coletadas utilizando-se a técnica de arrasto e técnica artesanal com rede, respectivamente, na costa portuguesa entre as cidades de Aveiro e Porto e transportadas para o Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar na cidade do Porto, Portugal. Os moluscos foram mantidos inteiros e armazenados entre camadas de gelo triturado (0 – 1°C), em contato direto. Três lulas e três sépias foram amostradas aleatoriamente após 1, 4, 8, 11 e 14 dias de armazenamento. Um segundo lote de lulas foi coletado e submetido às mesmas condições de armazenamento e dois indivíduos foram coletados em cada período de amostragem. Imediatamente após amostragem os animais foram eviscerados e congelados. Ao final dos experimentos de armazenamento, 15 sépias e 25 lulas, coletadas nos diferentes períodos de amostragem, foram enviadas congeladas e mantidas em dióxido de carbono líquido ao Departamento de Ciências da Carne (LMV) na Universidade de Ciências Agrícolas (SLU) na cidade de Uppsala, Suécia, onde as análises químicas foram realizadas.



**Figura 4.1.** A – lula (*Illex sp.*), fonte: [http://www.mbl.edu/marine\\_org](http://www.mbl.edu/marine_org) e B – sépia (*Sepia officinalis*), fonte: <http://www.cephbase.org>.

O peso médio das sépias foi de 565g (intervalo de 415 a 823g - n=15) e o peso médio das lulas foi de 163g (intervalo de 81 a 466g - n=25). Histogramas

correspondentes aos intervalos de peso de lulas e sépias estão apresentados na **Figura 4.2.**



**Figura 4.2.** Intervalos de peso de lulas (*Illex coindetii*) e sépias (*Sepia officinalis*).

#### 4.2.2. Reagentes e equipamentos

Agmatina (AGM), cadaverina (CAD),  $\beta$ -feniletilamina (PHE), putrescina (PUT) tiramina (TYR), assim como os reagentes 5-dimetil-aminonaftaleno-1-sulfonil (cloreto de dansila), trimetilamina (TMA), L-triptofano, uréia, diacetilmonoxima, tiosemicarbazida e antrona foram obtidos da companhia Sigma-Aldrich. Espermina (SPM), espermidina (SPD), histamina (HIS) e triptamina (TRY) eram da marca Fluka. Placas de cromatografia em camada delgada (20 x 20cm cobertas com sílica gel G60 de 0,25mm de espessura) e os demais reagentes e solventes foram obtidos da companhia Merck.

Os equipamentos Automatic TLC sampler 4 e TLC scanner 3 controlados pelo programa WinCATS da companhia CAMAG Instruments foram utilizados para aplicação das amostras nas placas de cromatografia e detecção e quantificação da intensidade de fluorescência das aminas dansiladas, respectivamente. Um espectrofotômetro Shimadzu foi utilizado para leitura das absorbâncias nos métodos colorimétricos.

### 4.2.3. Análises químicas

#### 4.2.3.1. *Preparo das amostras*

Os mantos das lulas e sépias coletadas em cada período de armazenamento foram picados em pedaços de tamanho inferior a  $0,5\text{cm}^2$  e amostras de cerca de 50g de manto picado de cada animal foram trituradas, separadamente, em processador de alimentos. Posteriormente, amostras de 10g do material homogeneizado foram transferidas para tubos cônicos de plástico, homogeneizadas com 20ml de TCA 5% por 1min usando um homogeneizador Ultra-Turrax. Após centrifugação (1200xg, 4min,  $18^\circ\text{C}$ ) o extrato sobrenadante foi filtrado em papel filtro. O precipitado foi re-extraído duas vezes com 10ml de TCA 5%, centrifugado e filtrado. Os sobrenadantes das três extrações foram combinados, diluídos a 50ml com TCA 5% em balões volumétricos e mantidos sob refrigeração até o momento da análise. O extrato oriundo de cada animal foi analisado separadamente e todas as análises químicas foram realizadas em duplicata.

#### 4.2.3.2. *Determinação de nitrogênio não protéico (NNP)*

NNP foi determinado em alíquotas do extrato TCA após digestão e destilação pelo método de Kjeldahl para determinação de nitrogênio total, HORWITZ (1980).

#### 4.2.3.3. *Determinação de aminas biogênicas*

Os teores das aminas biogênicas putrescina, cadaverina, espermina, espermidina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina foram determinados nos extratos de lula e sépia por cromatografia de camada delgada. As aminas biogênicas foram convertidas em seus derivados fluorescentes de acordo com a técnica utilizada por MIETZ & KARMAIS (1978) com modificações. Alíquotas de 1ml dos extratos em ácido tricloroacético 5% foram pipetadas em tubos de ensaio e adicionou-se  $\text{NaHCO}_3$  até saturação. Em seguida 1ml de cloreto de dansila (5mg/ml em

acetona) foi adicionado e misturado ao conteúdo de cada tubo, utilizando-se um misturador Vortex. Os tubos foram fechados e incubados a 40°C por 1 hora para promover a reação de dansilação. Após este período, 1ml de solução de glicina (0,1g/ml) foi adicionado em cada tubo e seguiu-se um aquecimento a 40°C por mais 20min. A acetona residual foi evaporada sob um fluxo de nitrogênio e adicionou-se 3ml de água em cada tubo. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi lavado com 2ml de éter dietílico 3 vezes para extrair as aminas dansiladas. Os extratos em éter dietílico foram combinados e evaporados em um fluxo de nitrogênio e o resíduo foi dissolvido em 1ml de acetato de etila. Padrões de cada amina biogênica em concentrações 5 a 50µg/ml em ácido tricloroacético 5% foram submetidos ao mesmo processo. Alíquotas de 10µl de acetato de etila de padrões e amostras foram aplicadas a 2cm da borda inferior das placas de cromatografia em bandas de 5mm e intervalos de 1cm, utilizando-se o equipamento Automatic TLC Sampler 4. A técnica de duplo desenvolvimento unidimensional foi utilizada: as placas foram desenvolvidas em clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (6:4:1 – v/v) por 10cm a partir na posição de aplicação, secas, e subsequente desenvolvimento em clorofórmio: trietilamina (6:1 – v/v) por 17cm. A intensidade da fluorescência emitida pelas aminas dansiladas foi avaliada a 330nm, utilizando-se o equipamento TLC Scanner 3. A exposição à luz foi minimizada durante todo o procedimento.

#### *4.2.3.4. Determinação de bases nitrogenadas voláteis (BNV)*

BNV foram determinadas através do método de HOWGATE, 1976. Alíquotas de 10ml do extrato TCA foram pipetadas em tubos de digestão macro Kjeldahl e alcalinizadas com óxido de magnésio (MgO). Os tubos foram acoplados a um destilador de nitrogênio marca TECATOR e seguiu-se a destilação sob fluxo de vapor. As BNV destiladas foram recebidas em ácido bórico, com indicador vermelho de metila e verde de bromocresol, até um volume de 125ml, e posteriormente tituladas com HCl 0,02N.

#### 4.2.3.5. Determinação de trimetilamina (TMA)

TMA foi determinada colorimetricamente como picrato de TMA pelo método de DYER (1945), modificado por MURRAY & GIBSON (1972).

#### 4.2.3.6. Determinação de triptofano livre

Triptofano livre foi determinado utilizando-se o método colorimétrico desenvolvido por CONTRERAS & LAPA GUIMARÃES (1989). Neste método o aminoácido triptofano reage com antrona formando um complexo púrpura com absorvância máxima a 546nm, permitindo determinar até um mínimo de 5µg de triptofano livre ou em proteínas.

#### 4.2.3.7. Determinação de uréia

Uréia foi determinada no extrato TCA pelo método colorimétrico da diacetil monoxima, sendo usado o Kit UREA NITROGEN Cat. nº 535A da Sigma Chemical Company. Neste método a uréia reage com diacetil (formado a partir da diacetilmonoxima em meio ácido) originando uma diazina púrpura com absorvância máxima a 545nm.

### 4.2.4. Expressão dos teores de aminas biogênicas, BNV, TMA, triptofano livre e uréia como % do NNP

Os teores de cada composto, expressos como mg/100g, foram transformados em % do NNP de acordo com o exemplo abaixo:

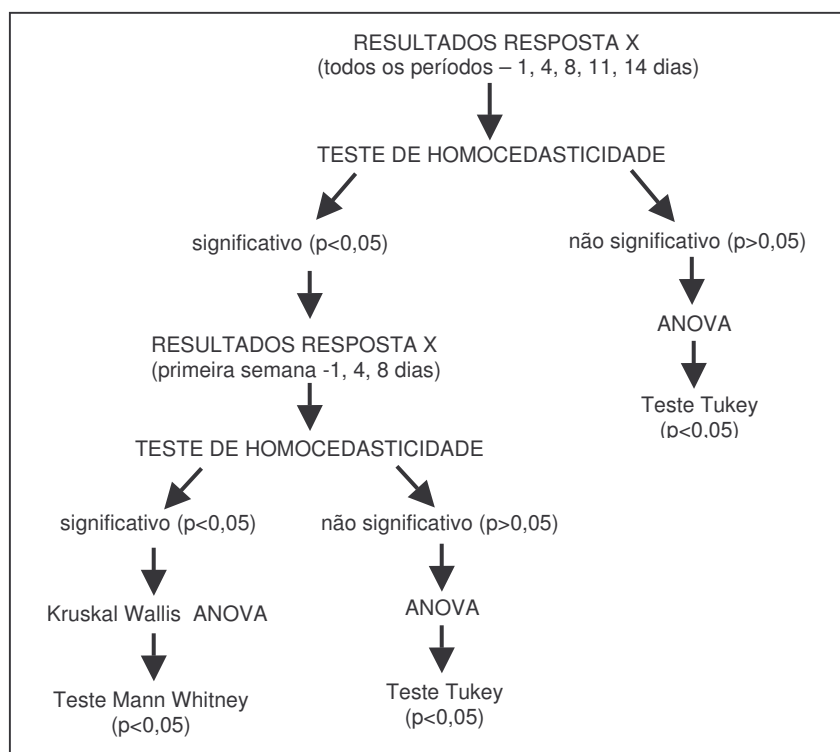
Triptofano ( $C_{11}H_{12}N_2O_2$ ) - peso molecular = 204,2    peso correspondente a átomos N =  $2 \times 14 = 28$   
% de N em triptofano =  $(28 \times 100)/204,2 = 13,7\%$

*I. coindetii* (I1) - dia 8    Teor de NNP = 450mg/100g    Teor de triptofano livre = 8mg/100g  
em 8mg de triptofano o teor de N =  $(8mg \times 13,7)/100$     N = 1,1mg  
1,1mg de N representam  $(1,1mg \times 100)/450mg$  do NNP = 0,24%  
portanto, em *I coindetii* (I1) – dia 8    teor de triptofano livre (% NNP) = 0,24%



#### 4.2.5. Análise estatística

De acordo com GACULA (1984) as regressões linear simples e quadrática e a função exponencial são os modelos estatísticos mais usados em estudos de vida de prateleira, quando se quer relacionar a taxa de perda de qualidade de um produto em função do tempo de armazenamento e estimar sua vida útil. Assim, modelos estatísticos (linear, quadrático e exponencial) foram avaliados para representar as variações nas respostas em função do tempo de armazenamento. Níveis de significância e índices de determinação ( $R^2$ ) foram determinados para cada modelo e testes de falta de ajuste ( $p < 0,05$ ) foram executados. Foi escolhido para cada resposta o modelo significativo ( $p < 0,05$ ) com maior  $R^2$ . Análise de variância e os testes de média, Tukey e Mann Whitney ( $p < 0,05$ ), foram executados de acordo com o esquema apresentado na **Figura 4.3**. Foram utilizados os programas Statistica, versão 6.0 (StatSoft, 1995, Tulsa, OK, USA) e Excel 2002 (Microsoft Corporation 1985-2001).



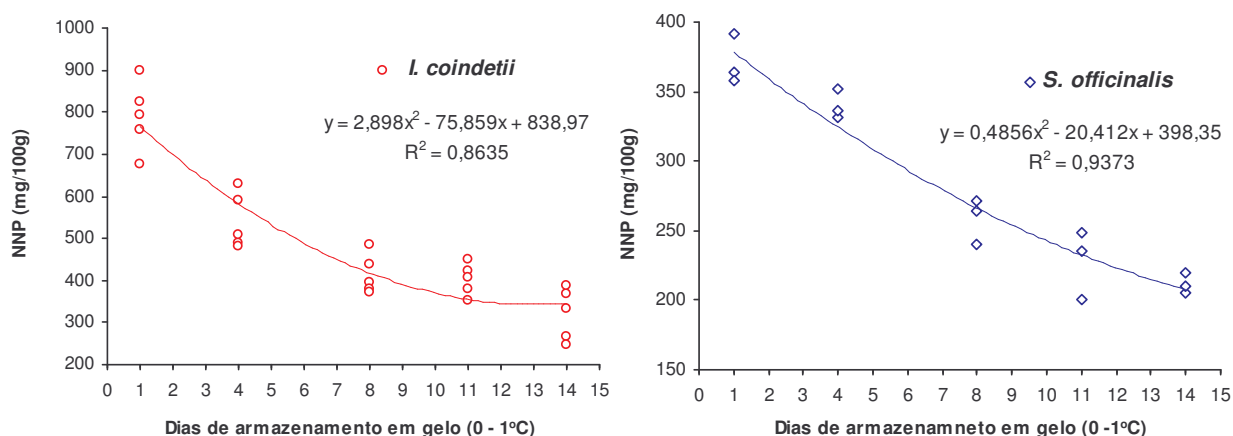
**Figura 4.3.** Testes realizados para comparação de médias dos diferentes períodos de armazenamento.

## 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1. Nitrogênio não protéico (NNP)

A concentração média inicial de NNP em *Illex coindetii* foi de 789,6mg/100g e em sépia de 371,24mg/100g. RUIZ-CAPILLAS et al. (2002) encontraram valores de NNP variando entre 1161 e 1182mg/100g, em machos e fêmeas de *Illex coindetii*, respectivamente.

Ocorreram decréscimos contínuos dos teores de NNP durante o armazenamento nas duas espécies de cefalópodes, os quais foram bem representados por regressões quadráticas (**Figura 4.4**). Durante a primeira semana de armazenamento foram detectados decréscimos significativos ( $p < 0,05$ ) do NNP entre os dias 1, 4 e 8 em lula e entre os dias 4 e 8 em sépia. Para sépia, 30,40% do NNP havia sido perdido após 8 dias de armazenamento em gelo, enquanto para lula este valor chegou a 47,56% do NNP.



**Figura 4.4.** Teores de nitrogênio não protéico (NNP) durante o armazenamento de lula (*Illex coindetii*) e sépia (*Sepia officinalis*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão quadrática ajustadas para os resultados obtidos. Modelos com  $p < 0,0001$ .

A diminuição de NNP durante o armazenamento de pescados em gelo se deve à lixiviação de compostos solúveis do músculo e tem sido observada por diversos autores. RAGHUNATH (1984) relatou que quando mantos de *Loligo duvauceli* foram mantidos em contato direto com gelo triturado por 8 horas, a concentração do NNP nos mantos diminuiu de 0,72 para 0,43g/100g enquanto que na água de degelo aumentou de 0,23 para 3,05mg/ml.

Em *Loligo plei* a diminuição do NNP também foi intensa nos primeiros dias de armazenamento, sendo perdidos 69,7% do NNP até o dia 9 (LAPA-GUIMARÃES et al., 2005). O formato peculiar do corpo das lulas e sépias, que permite o contato da água na parte externa e também interna do manto, gera uma grande superfície de contato que facilita a extração dos compostos solúveis do músculo. A intensa lixiviação de compostos solúveis é uma característica dos cefalópodes armazenados em gelo que causa uma diminuição da eficiência de muitas determinações químicas para avaliação do frescor.

#### 4.3.2. Aminas biogênicas

Agmatina, putrescina, cadaverina, espermina e espermidina foram detectadas durante o armazenamento de sépias e lulas. Os teores determinados apresentaram uma grande variabilidade e estão apresentados por intervalos de concentração (**Tabelas 4.1 e 4.2**).

**Tabela 4.1. Intervalos de concentração de aminas biogênicas em lula (*Illex coindetii*) durante o armazenamento em gelo.**

Armazenamento (dias)	Aminas biogênicas (mg/100g)				
	Agmatina	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
1	8,7 - 18,4	nd	0 - 4,0	0 - 5,9	1,2 - 9,5
4	8,9 - 18,6	nd	0 - 3,7	0 - 6,3	0,2 - 18,7
8	12,0 - 21,7	0 - 1,7	0 - 2,2	0 - 4,4	1,2 - 9,2
11	15,4 - 23,1	nd	0 - 14,6	0 - 1,5	0,2 - 9,8
14	24,7 - 31,8	0,3 - 1,9	0,5 - 5,3	0 - 1,6	0,7 - 7,7

nd = não detectado

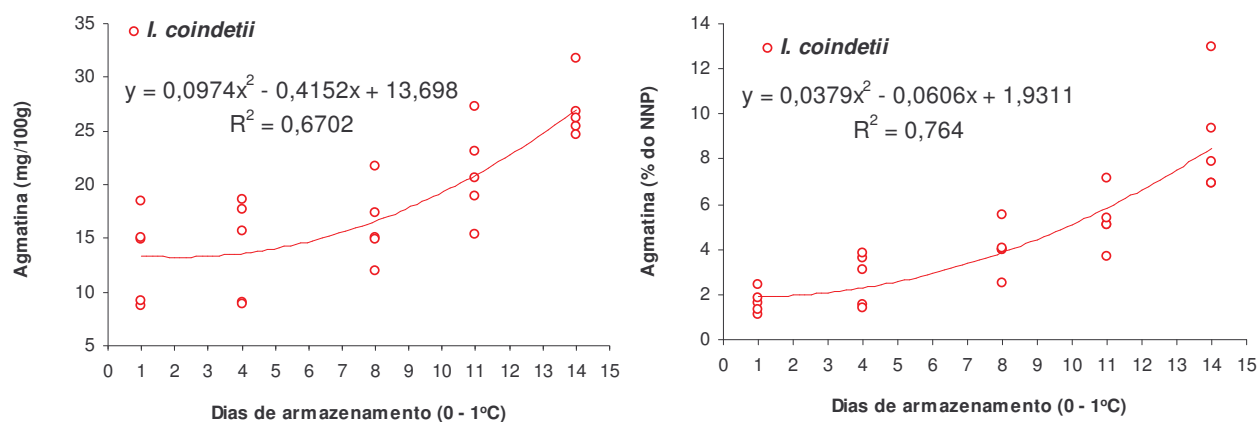
**Tabela 4.2. Intervalos de concentração de aminas biogênicas em sépia (*Sepia officinalis*) durante o armazenamento em gelo.**

Armazenamento (dias)	Aminas biogênicas (mg/100g)				
	Agmatina	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
1	12,0 - 13,8	0 - 4,3	0 - 3,1	0 - 4,9	0 - 11,0
4	14,4 - 15,5	0 - 1,4	0 - 2,8	0 - 2,6	0 - 9,1
8	13,2 - 15,2	0 - 2,6	0,1 - 2,9	0 - 3,6	0 - 9,0
11	21,6 - 25,9	0,6 - 2,2	1,2 - 3,3	0 - 2,9	0 - 4,6
14	11,1 - 13,5	0,1 - 1,2	0,6 - 2,1	nd	0 - 4,3

nd = não detectado

Agmatina foi a única amina biogênica detectada durante todo o armazenamento nas duas espécies de cefalópodes. Arginina é extremamente abundante no estado livre em invertebrados (YAMANAKA et al., 1987; OHASHI et al., 1991) onde supre funções da creatina como reserva de fosfato para reposição de ATP (CONTRERAS, 2002). Agmatina pode ser facilmente formada a partir da descarboxilação de arginina, o que pode explicar a presença predominante de agmatina nas duas espécies de cefalópodes desde o início do armazenamento.

Em *Illex coindetii* ocorreram tendências de aumento da concentração de agmatina durante o armazenamento, que foram representadas por modelos de regressão quadrática, seja quando os teores foram expressos como mg/100g ou como % do NNP (Figura 4.5).



**Figura 4.5. Teores de agmatina, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula (*Illex coindetii*). As linhas vermelhas representam os modelos de equação quadrática ajustadas para os resultados obtidos. Modelos com  $p < 0,0001$ .**

A variabilidade dos teores de agmatina determinados em cada uma das cinco lulas amostradas por período de armazenamento, resultou em um modelo de regressão quadrática com coeficiente de determinação baixo ( $R^2 = 0,67$ ) quando os teores foram expressos em mg/100g. Porém, quando os teores de agmatina foram expressos como % do NNP foi obtido um modelo com índice de correlação maior ( $r = 0,82$ ) entre os teores de agmatina e o tempo de armazenamento. Embora os modelos de regressão quadrática mostrem uma tendência de aumento dos teores de agmatina em *Illex coindetii*, somente após 11 dias de armazenamento houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos teores de agmatina no músculo.

YAMANAKA et al. (1987), estudaram a formação de agmatina, putrescina, cadaverina, triptamina e tiramina em lula da espécie *Todarodes pacificus* armazenada em gelo por 14 dias. Agmatina e triptamina foram as únicas aminas biogênicas detectadas desde o início do armazenamento. Agmatina aumentou continuamente desde o início do armazenamento, sendo considerada útil como índice de frescor, enquanto cadaverina e putrescina aumentaram apenas após 8 dias de armazenamento, sendo consideradas úteis como índices suplementares. Em oposição, OHASHI et al. (1991) concluíram que embora os teores de agmatina tenham aumentado antes do início da decomposição inicial em *Todarodes pacificus*, parecem não refletir o frescor inicial. Putrescina, agmatina e cadaverina também foram as aminas biogênicas mais produzidas na lula *Todaropsis eblanae* após 1 semana de armazenamento a 4°C (PAARUP et al., 2002).

Os resultados do presente estudo indicam que agmatina é a amina biogênica com maior potencial para utilização como índice de qualidade em cefalópodes, por estar presente desde o início do armazenamento e por apresentar uma tendência de aumento. No entanto, a ausência de alterações significativas durante a primeira semana caracteriza esta amina biogênica como um índice de deterioração.

#### 4.3.3. Bases nitrogenadas voláteis (BNV) e trimetilamina (TMA)

*I. coindetii* apresentava 9,90mg de BNV/100g de músculo e *S. officinalis* 7,71mg/100g de músculo no primeiro dia de armazenamento. Estes teores são inferiores aos relatados para outras espécies de cefalópodes, indicando que os animais possuíam excelente qualidade. Na lula *Loligo plei* fresca foram determinadas 15,7mg de BNV/100g de músculo (LAPA-GUIMARÃES et al., 2005).

Os teores médios de BNV em lula aumentaram progressivamente até atingirem 22,80mg/100g de músculo no 14<sup>o</sup> dia de armazenamento. Regressões lineares se ajustaram significativamente ( $p < 0,05$ ) às alterações de BNV em lula, expressas em mg/100g ou % do NNP (**Figura 4.6**). A heterogeneidade entre as variâncias dos resultados obtidos entre os dias 1, 4 e 8 torna inadequada a utilização de testes paramétricos para detectar a existência de diferenças significativas nos teores de BNV em lula durante a primeira semana de armazenamento em gelo. O teste não paramétrico de Mann-Whitney indicou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de BNV entre os dias 4 e 8 quando os teores foram expressos como mg/100g e entre os dias 1 e 4 quando os teores foram expressos com % do NNP.

Em sépia os teores médios de BNV também mostraram uma tendência de aumento progressivo, de 7,71mg/100g no início do armazenamento até 28,59mg/100g após 14 dias em gelo. Regressões quadráticas se ajustaram significativamente ( $p < 0,05$ ) às alterações de BNV em sépia (**Figura 4.7**).

Comparação entre médias de BNV dos dias de armazenamento 1, 4 e 8, utilizando o teste de Tukey indicaram aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) dos teores de BNV em sépia entre os dias 4 e 8, quando os teores de BNV foram expressos como mg/100g ou como % do NNP.

Observa-se pelas equações dos modelos de regressão linear e quadrática que quando os resultados de BNV foram expressos como % do NNP foram obtidos modelos com maior índice de determinação para as duas espécies de cefalópodes.

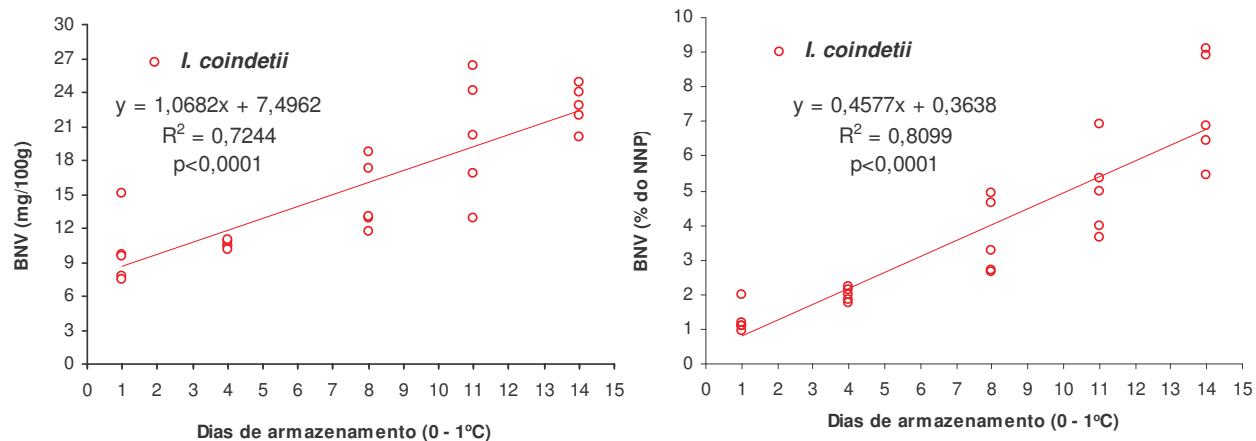


Figura 4.6. Teores bases nitrogenadas voláteis (BNV), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula (*Illex coindetii*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão linear ajustadas para os resultados obtidos (Teste de falta de ajuste não significativo).

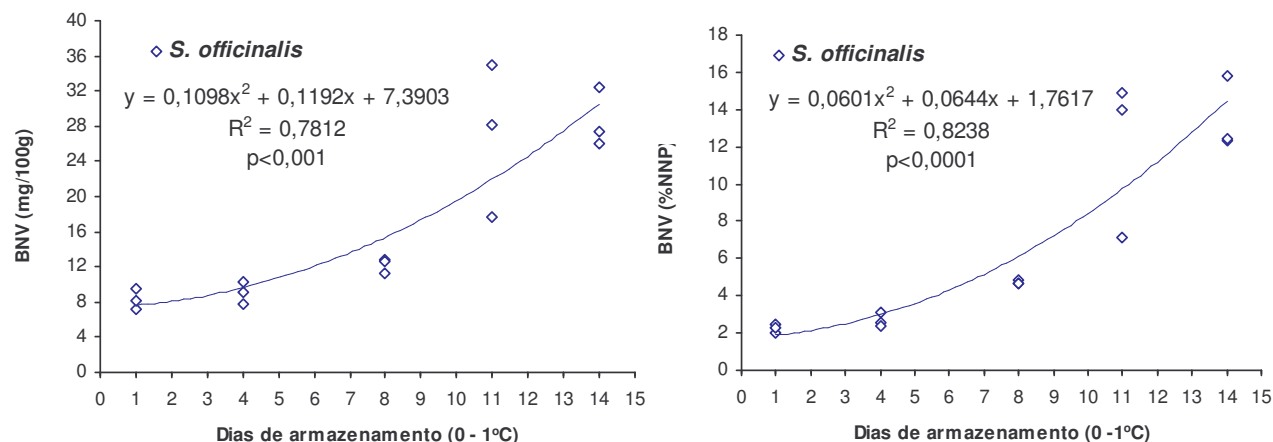


Figura 4.7. Teores de bases nitrogenadas voláteis (BNV), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia (*Sepia officinalis*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão quadrática ajustadas para os resultados obtidos (Teste de falta de ajuste não significativo).

Base nitrogenadas voláteis têm sido consideradas úteis como índices de deterioração e não como índices de frescor em cefalópodes por diversos autores (YAMANAKA et al., 1987; OHASHI et al., 1991; CIVERA et al., 1999). Na lula *Todarodes pacificus* a produção de BNV foi intensa no período em que se identificou o início da putrefação, porém quando as lulas foram mantidas em gelo

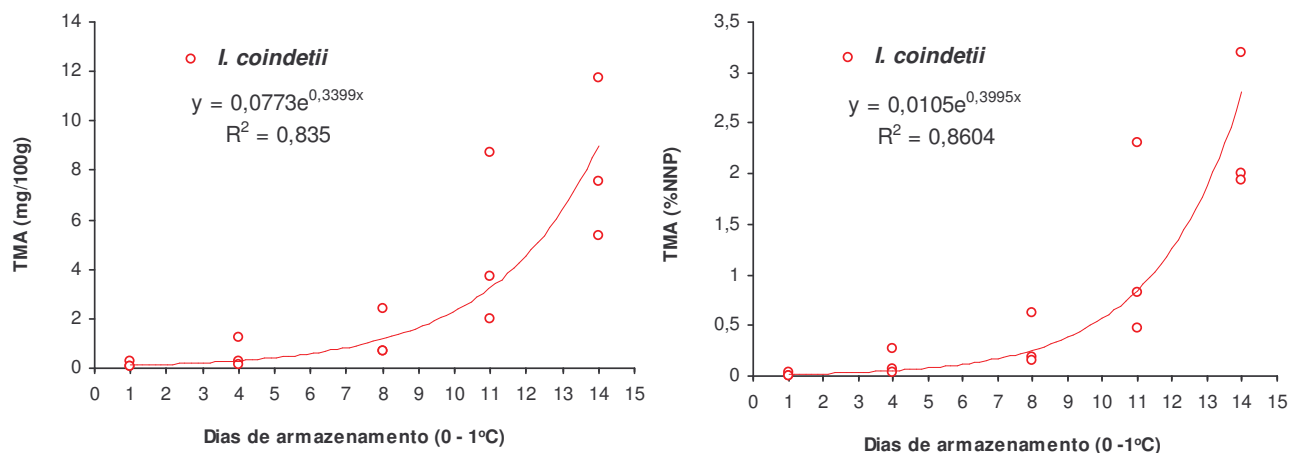
os valores foram inferiores a 16mg/100g durante 14 dias de armazenamento (OHASHI et al., 1991). Os teores de BNV determinados por YAMANAKA et al. (1987) para a mesma espécie de lula foram bastante distintos, sendo de 6,75mg/100g no primeiro dia de estocagem, atingindo 30,78mg/100g no estágio de início de decomposição e 77,42mg/100g quando as lulas tornaram-se sensorialmente inaceitáveis no 10º dia de armazenamento a 1°C. Em *Loligo plei* armazenada em contato com gelo houve uma diminuição dos teores de BNV no início do armazenamento (LAPA-GUIMARÃES et al., 2005). Para lulas da espécie *Illex illecebrosus* o teor de 45mg de BNV/100g de músculo foi sugerido como limite de aceitação para consumo humano (KE et al., 1984).

Os teores médios de TMA aumentaram progressivamente de 0,11mg/100g para 8,40mg/100g em *Illex coindetti* e de 0,33mg/100g para 10,03mg/100g em *Sepia officinalis* após 14 dias de armazenamento em gelo. A tendência de aumento foi mais lenta nos primeiros dias de armazenamento e mais intensa após o dia 8. Este padrão de produção de TMA foi bem representado por regressões exponenciais ( $p < 0,05$ ) tanto quando TMA foi expressa como mg/100g de músculo como quando expressa em % do NNP, para lula (**Figura 4.8**) e também para sépia (**Figura 4.9**).

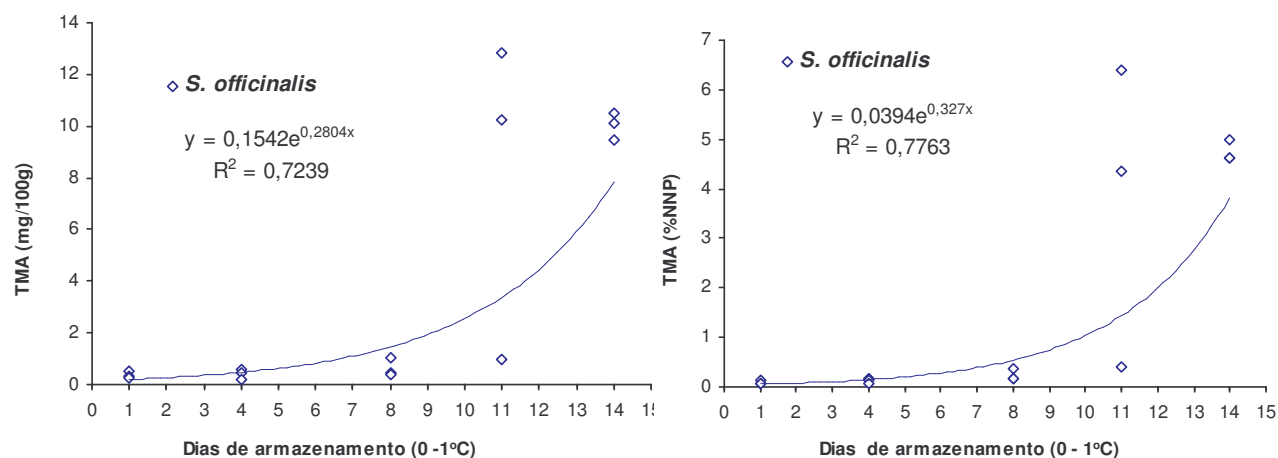
Testes de comparação de médias utilizando o teste de Tukey mostraram que o aumento nos teores de TMA durante a primeira semana de armazenamento não foi significativo ( $p < 0,05$ ) para as duas espécies de cefalópodes quando TMA foi expressa como mg/100g. O teste de Mann-Whitney indicou diferença significativa entre os dias 1 e 8 quando os teores de TMA foram expressos como % do NNP em *I. coindetti*.

LEBLANC & GILL (1984) também detectaram um padrão de produção exponencial de TMA na lula *Illex illecebrosus* armazenada a 2,5°C; em um período lag de cerca de 3 dias, pouca ou nenhuma TMA foi detectada no músculo. Na lula *Loligo plei* os valores de TMA foram bastante baixos durante a primeira semana de armazenamento e valores superiores a 1mg/100g somente foram encontrados após 12 dias em gelo (LAPA-GUIMARÃES et al., 2005).





**Figura 4.8.** Teores de trimetilamina (TMA), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula (*Illex coindetii*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão exponencial ajustadas para os resultados obtidos.



**Figura 4.9.** Teores de trimetilamina (TMA), expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia (*Sepia officinalis*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão exponencial ajustadas para os resultados obtidos.

Observa-se pelas equações dos modelos de regressão exponencial que quando os resultados de TMA foram expressos como % do NNP foram obtidos modelos com maior índice de determinação para as duas espécies de cefalópodes.

A trimetilamina se origina em pescados devido à ação de enzimas bacterianas sobre o óxido de trimetilamina. LISTON (1980) e SIKORSKI et al. (1994) relataram que há evidências de que a produção de TMA correlaciona-se bem com o aumento da população bacteriana no músculo de pescado, sendo um dos principais responsáveis pelo odor de pescado deteriorado. O padrão de produção exponencial de TMA em *I. coindetii* e *S. officinalis* é característico de um composto formado unicamente devido à atividade bacteriana; onde uma formação mais intensa somente ocorre em fases mais avançadas do armazenamento, quando provavelmente já existe um número de bactérias suficiente para produção de enzimas específicas.

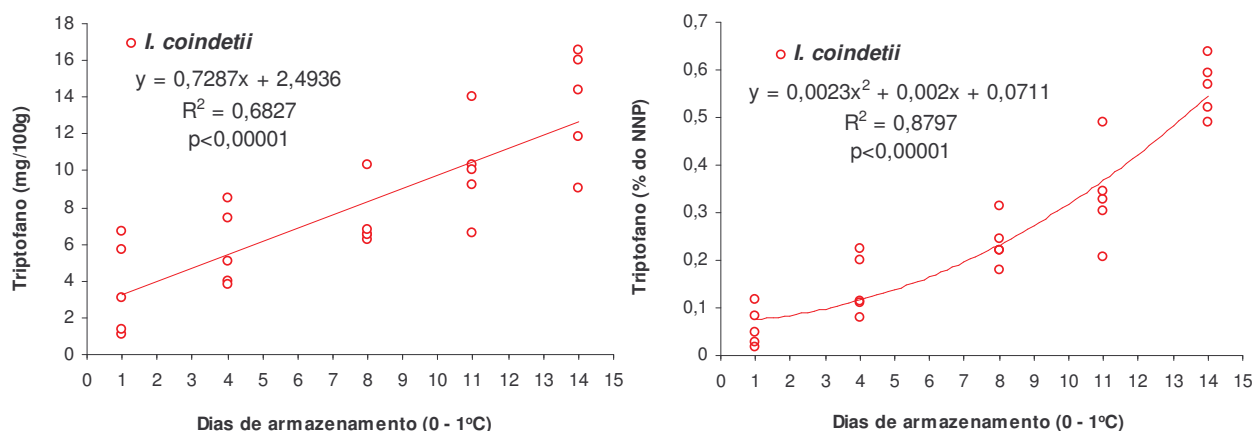
Em lulas geralmente a rejeição sensorial ocorre quando as contagens de microorganismos são relativamente baixas. Em *Loligo plei* adequadamente capturada, manipulada e mantida em gelo as contagens de bactéria psicotróficas se mantiveram abaixo de  $10^6$  UFC/g após 16 dias de armazenamento, porém características sensoriais indesejáveis passaram a predominar após o 7º dia de armazenamento, indicando o final da vida de prateleira (LAPA-GUIMARÃES et al., 2001). LEBLANC & GILL, (1984) também relataram que deterioração microbiana geralmente não é um problema importante em relação à qualidade de lulas.

KE et al. (1984) recomendam um valor máximo de 10mg de N-TMA/100g como limite de aceitação de lulas da espécie *Illex illecebrosus* para consumo humano. No presente estudo tal limite foi atingido somente após o dia 11 em *I. coindetii*, e no dia 8 em *S. officinalis*.

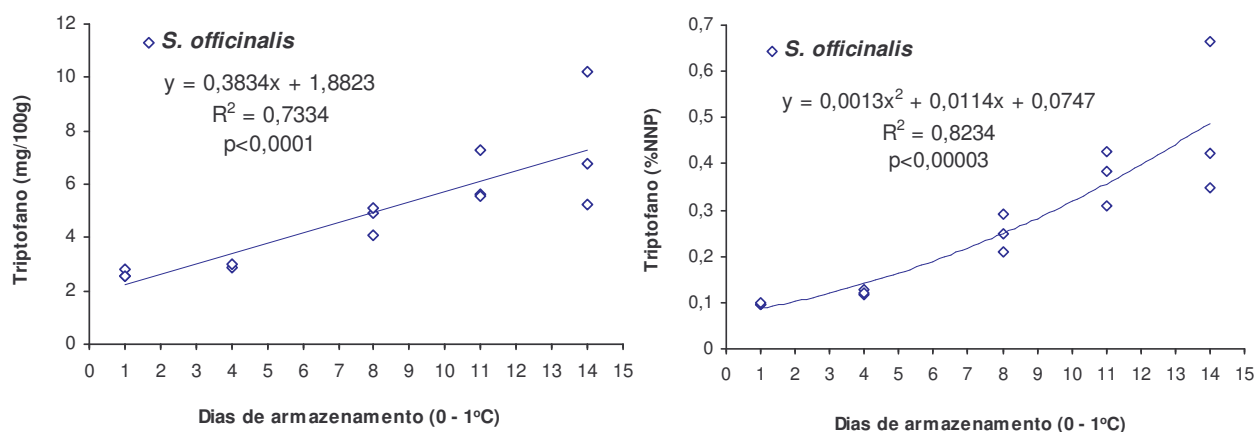
#### **4.3.4. Triptofano livre e uréia**

Os teores iniciais de triptofano livre em *Illex coindetii* e *Sepia officinalis* foram 5,14 e 2,62mg/100g, respectivamente. O teor detectado em sépia foi bastante semelhante ao valor de 2,88mg/100g encontrado em *Loligo plei* (LAPA-GUIMARÃES, 1999).

Os teores médios de triptofano livre aumentaram continuamente até 14,24mg/100g em *Illex coindetii* e até 7,41mg/100g em *Sepia officinalis* ao final do armazenamento. Esta tendência de aumento dos teores de triptofano livre foi bem representada por regressões lineares ( $p < 0,05$ ) quando triptofano livre foi expresso como mg/100g de músculo, e por regressões quadráticas quando expresso em % do NNP, para lula (**Figura 4.10**) e também para sépia (**Figura 4.11**).



**Figura 4.10. Teores de triptofano livre, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula (*Illex coindetii*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão linear e quadrático ajustados para os resultados obtidos (Teste de falta de ajuste não significativo).**



**Figura 4.11. Teores de triptofano livre, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia (*Sepia officinalis*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão linear ajustadas para os resultados obtidos (Teste de falta de ajuste não significativo).**

Observa-se pelas equações dos modelos de regressão linear e quadrático que, quando os resultados de triptofano livre foram expressos como % do NNP foram obtidos modelos com maior índice de correlação entre o parâmetro avaliado e o tempo de armazenamento para as duas espécies de cefalópodes.

Testes de média entre os dias 1, 4 e 8 para *Illex coindetii* utilizando o teste de Tukey indicaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos teores de triptofano livre entre os dias 1 e 8. Em *Sepia officinalis* o teste de Tukey indicou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dos teores de triptofano livre expressos como mg/100g entre os dias 4 e 8, enquanto o teste de Mann-Whitney indicou aumento ( $p < 0,05$ ) a partir do dia 4 quando os teores de triptofano livre foram expressos como % do NNP.

O aumento da concentração de triptofano livre no músculo de *Illex coindetii* e *Sepia officinalis* demonstra a existência de uma proteólise relativamente intensa. ROMO et al. (1996) estudaram a formação de triptofano livre em *Dosidicus gigas* e determinaram que os animais recém capturados continham 0,66mg de triptofano livre/100g, teor que aumentou para 2,44mg/100g em 72h de armazenamento a temperatura ambiente.

O teor médio inicial de uréia em lula foi 5,40mg/100g. Ocorreu um aumento até o dia 8, uma diminuição no dia 11 e um novo aumento até o dia 14 quando foi atingido o teor de 18,80mg/100g (**Figura 4.12**). Devido a este padrão de produção modelos estatísticos não foram avaliados para representar as alterações nos teores de uréia em lula.

Os teores médios de uréia em sépia aumentaram continuamente durante o armazenamento, variando de 7,98mg/100g no início do armazenamento até 43,80mg/100g após 14 dias em gelo. Modelos de regressão linear se ajustaram às alterações nos teores de uréia tanto quando expressas como mg/100g quanto como % do NNP (**Figura 4.13**).

Observa-se pelas equações dos modelos de regressão linear que quando os resultados de uréia em sépia foram expressos como % do NNP foi obtido um modelo com maior significância e maior índice de correlação entre o parâmetro avaliado e o tempo de armazenamento.

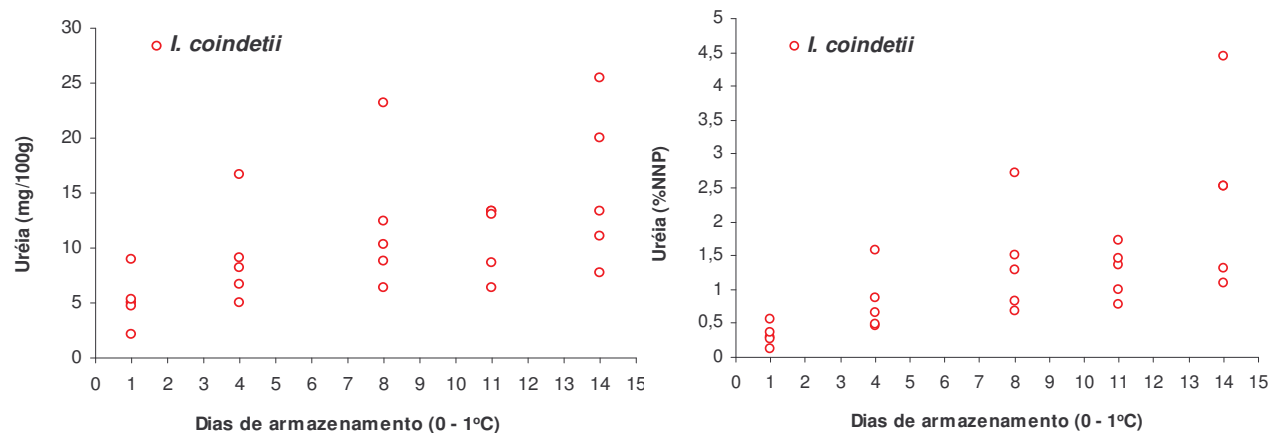


Figura 4.12. Teores de uréia, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de lula (*Illex coindetii*).

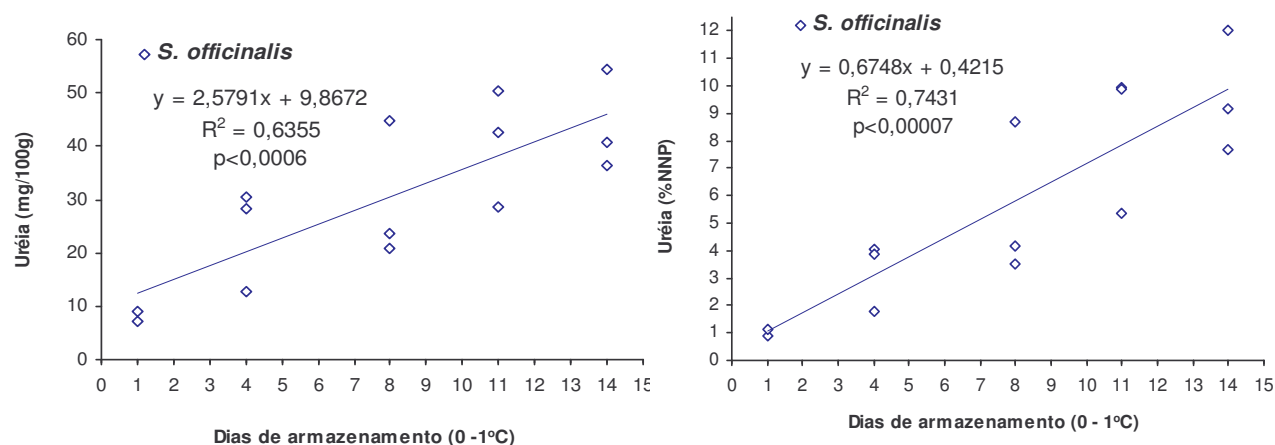


Figura 4.13. Teores de uréia, expressos como mg/100g e como % do NNP, durante o armazenamento de sépia (*Sepia officinalis*). As linhas contínuas representam os modelos de regressão linear ajustadas para os resultados obtidos.

Em lulas da espécie *Doryteuthis bleekeri* armazenadas em bolsas plásticas em gelo, o teor de uréia aumentou gradualmente no músculo, de uma concentração inicial de 0,5µmol/g para 2,75µmol/g em 15 dias, indicando sua utilidade como índice de frescor (OTSUKA et al., 1992). Em *Loligo plei* os teores de uréia aumentaram de 3,49mg/100g para 33,58mg/100g após 16 dias quando as lulas foram mantidas em gelo sem contato direto (embaladas em bolsas plásticas), porém, quando mantidas em contato direto com gelo, os teores de uréia não

aumentaram continuamente. Os teores mais elevados (8,72mg/100g) foram encontrados no dia 10 e posteriormente houve uma diminuição dos valores (LAPA-GUIMARÃES et al. 2005).

No presente estudo, comparação entre médias dos dias 1, 4 e 8 mostraram que o aumento de uréia em sépia não foi significativo durante a primeira semana de armazenamento. Somente no dia 11 foi detectado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao início do armazenamento, o que indica que uréia poderia ser considerada um índice de deterioração.

Em um estudo realizado com *Loligo plei*, em que os animais foram coletados e imediatamente submetidos ao armazenamento em contato direto com gelo em condições controladas, os teores de BNV diminuíram continuamente até o 16º dia de armazenamento e os teores de TMA, uréia e triptofano não foram alterados consideravelmente. Quando os animais foram colocados em sacos plásticos para evitar o contato direto com a água os valores de BNV, TMA, uréia e triptofano aumentaram continuamente (LAPA-GUIMARÃES, 1999). A intensa lixiviação de compostos solúveis que ocorreu quando as amostras ficaram em contato direto com gelo explica este fenômeno. No presente estudo ocorreram aumentos dos teores de BNV, TMA, uréia e triptofano em lula e sépia embora os animais tenham sido mantidos em gelo, o que também é relatado em outros estudos. Vários fatores, como espécie, tamanho dos animais, atividade dos sistemas enzimáticos proteolíticos endógenos, tipo de microbiota contaminante, forma de acondicionamento em gelo, granulometria do gelo empregado, proporção entre animais e gelo, pode alterar consideravelmente a intensidade de lixiviação e conseqüentemente a detecção dos compostos avaliados.

#### 4.4. CONCLUSÕES

BNV e triptofano livre podem ser considerados bons índices de frescor para *I. coindetti* e *S. officinalis*, pois ocorreram aumentos progressivos de seus teores durante o armazenamento em gelo e diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram detectadas durante a primeira semana de armazenamento.

Nenhuma das aminas biogênicas avaliadas foi útil como índice de qualidade em *S. officinalis*. Agmatina foi a amina biogênica com maior potencial para utilização como índice de qualidade para a lula *Illex coindetii*. No entanto, a ausência de alterações significativas durante a primeira semana de armazenamento em gelo caracterizou esta amina biogênica como um índice de deterioração.

Uréia foi inadequada como índice de qualidade para *I. coindetti*. Uréia pode ser considerada um índice de deterioração em *S. officinalis* uma vez que um aumento significativo foi observado após 11 dias de armazenamento.

Os teores de TMA (% do NNP) aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em *I. coindetti* durante a primeira semana de armazenamento, o que sugere que TMA poderia servir como um índice de frescor para a espécie. TMA pode ser considerada um índice de deterioração para *S. officinalis*.

O decréscimo ( $p < 0,05$ ) do NNP no músculo das duas espécies durante o armazenamento comprovou a ocorrência de lixiviação. O efeito da lixiviação, que dificulta o acúmulo dos compostos solúveis no músculo, foi minimizado quando os teores dos diversos compostos foram expressos como % do NNP.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CIVERA, T.; GRASSI, M. A.; PATTONO, D. Caratteristiche chimiche e microbiologiche di molluschi cefalopodi nel corso della conservazione. **Industrie Alimentari**, v.38, p. 933-937, 1999.
- COBB III, B. F.; ALANIZ, I.; THONSON, C. A. Biochemical and microbiological studies on shrimp: volatile nitrogen and aminonitrogen analyses. **Journal of Food Science**, v. 38, n. 3, p. 431-436, 1973.
- COBB III, B. F.; VANDERZANT, C.; HANNA, M. O.; YEH, C. S. Effect of ice storage on microbiological and chemical changes in shrimp in melting ice in a model system. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 1, p.24-29, 1976.
- COLLIGNAN, A.; MONTET, D. tenderizing squid mantle by marination at different pH and temperature levels. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 31, p. 673-679, 1998.
- CONTRERAS, G. E. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia (FUNEP), 1994. 409p.
- CONTRERAS, G. E. **Bioquímica de pescados e invertebrados**. Santiago de Chile: Centro de Estudios em Ciência y Tecnología de Alimentos, 2002. 309p.
- CONTRERAS, G. E.; LAPA GUIMARÃES, J. G. Determinação rápida de triptofano por reação com antrona. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 12., 1989, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos**. Rio de Janeiro, SBCTA, 1989. p.152.
- DYER, W. J. Amines in fish muscle. 1. Colorimetric determination of TMA as picrat salt. **Journal of the Fisheries Research Board Canada**, v.6, p.351-358, 1945.
- FAO – Food and Agriculture Organization. **Yearbook of Fishery Statistics**: summary tables 2001. Fish, crustaceans, mollusks, etc. Disponível em: <http://www.fao.org/fi/statist/statist/asp>. Acesso em: 05 maio 2005.
- GACULA, M. C.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. New York: Academic Press, 1984. 503p.
- GUERRA, A. Cephalopod resources of the world: a present day view. **The Second World Cephalopod Conference**. Squid. November 11-13 Madrid, Espanha, 1991.
- GUERRA, A. Explotación mundial de cefalópodos. In: **II Jornadas Internacionales sobre utilización de cefalópodos**: Aspectos científicos y tecnológicos. Madrid, Espanha: Instituto del Frío, 1996.



- HORWITZ, W. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 13<sup>o</sup> ed., Washington D.C., A.O.A.C. 1980.
- HOWGATE, P. Determination of total volatile bases. **Torry Research Station**. Aberdeen, TD 564, Appendix 4, 1976.
- KE, P. J.; BURNS, B. G.; WOYEWODA, A. D. Recommended procedures and guidelines for quality evaluation of atlantic short-fin squid (*Illex illecebrosus*). **Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, v.17, n.5, p. 276-281, 1984.
- LAPA-GUIMARÃES, J. **Estudos de índices químicos, sensoriais, microbiológicos e instrumentais para avaliação do frescor de lulas (*Loligo plei*, Bainville, 1823) armazenadas em gelo**. Campinas, 1999. 151p. Tese (Mestrado em tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- LAPA-GUIMARÃES, J.; FELÍCIO, P. E.; CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. Chemical and microbial analyses of squid muscle (*Loligo plei*) during storage in ice. **Food Chemistry**, v. 91, p. 477-483, 2005.
- LAPA-GUIMARÃES, J.; SILVA, M. A. A.; FELÍCIO, P. E.; CONTRERAS GUZMÁN, E. Sensory, colour and psychrotrophic bacterial analyses of squids (*Loligo plei*) during storage in ice. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 35, n. 1, p. 21-29, 2002.
- LEBLANC, R. J.; GILL, T. A. Ammonia as an objective quality index in squid. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.17, n.4, p. 195-201, 1984.
- LISTON, J. **Microbiology in fishery sciences**. In: CONNELL, J. J. (Ed) Advances in fishery science and technology. Surrey: Fishing News Books, 1980. p.138-157.
- 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. **Journal of Food and Technology**, v.7, n.1, p.35-46, 1972.
- MELENDO, J. A.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P. Tenderization of squid (*Loligo vulgaris* and *Illex coindetii*) with bromelain and a bovine spleen lysosomal-enriched extract. **Food Research International**, v. 5, n. 5, p. 335-341, 1997.
- MIETZ, J. L. & KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. **Journal of the Association of Official Analysts Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 139-145, 1978.
- NAKAMURA, K.; ISHIKAWA, S.; KIMOTO, K.; MIZUNO, Y. Changes in freshness of japanese common squid during cold storage. **Bulletin Tokai Reg. Fishery Research Lab.** v.118, p.45, 1985.

- OHASHI, E.; OKAMOTO, M.; OZAWA, A.; FUJITA, T. Characterization of common squid using several freshness indicators. **Journal of Food Science**, v. 56, n.1, p. 161-163, 174, 1991.
- OTSUKA, Y.; TANAKA, S.; NISHIGAKY, K.; MIYAGAWA, M. Change in the contents of arginine, ornithine and urea in the muscle of marine invertebrates stored in ice. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.56, n.6, p.863-866, 1991.
- PAARUP, T., SANCHEZ, J. A., MORAL, A., CHRISTENSEN, H., BISGAARD, M. & GRAM, L. Sensory, chemical and bacterial changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). **Journal of Applied Microbiology**, v.92, n.5, p.941-950, 2002.
- RAGHUNATH, M. R. Soluble nitrogen losses in squids (*Loligo duvauceli*) during storage in slush ice. **Journal of Science and technology**, v. 21, n. 1, p. 50-52, 1984.
- ROMO, C.; ASTUDILLO, J.; MUÑOZ, O.; CONTRERAS, E. Determinación de índices bioquímicos y funcionales relevantes para evaluar la conservación de jibia (*Dosidicus gigas*) a bordo. In: **Proceedings of a workshop on fish and mollusc larviculture**, Santiago, p.197-213, 1996.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, A; MORALES, J; MONTERO, P. The effect of frozen storage on the functional properties of the muscle of volador (*Illex coindetii*). **Food Chemistry**, v. 78, p. 149-156, 2002A.
- RUIZ-CAPILLAS, C.; MORAL, A; MORALES, J; MONTERO, P. Characterization of non-protein nitrogen in the cephalopods volador (*Illex coindetii*), pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrhosa*). **Food Chemistry**, v. 76, p. 165-172, 2002B.
- SIKORSKI, Z. E., KOLAKOWSKA, A., BURT, J. R. Cambios bioquímicos y microbianos subsiguientes a la captura. In: SIKORSKI, Z. E. (Ed). Tecnología de los productos del mar: recursos, composición y conservación. Zaragoza: Acribia, 1994. cap.4, p.73-101.
- VILLANUEVA, R.; RIBA, J.; RUÍZ-CAPILLAS, C.; GONZÁLEZ, A. V.; BAETA, M. Amino acid composition of early stages of cephalopods and effect of amino acid dietary treatments on *Octopus vulgaris* paralarvae. **Aquaculture**, v. 242, p. 455-478, 2004.
- YAMANAKA, H.; SHIOMI, K. & KIKUCHI, T. Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). **Journal of Food Science**, v.52, n.4, p.936-938, 1987.

## CONCLUSÕES GERAIS

O sistema de solventes clorofórmio: éter dietílico: trietilamina (6:4:1 – v/v) seguido de clorofórmio: trietilamina (6:1 – v/v), desenvolvido neste estudo, foi eficaz na separação das aminas biogênicas agmatina, putrescina, cadaverina, triptamina, espermidina, histamina, espermina, tiramina e feniletilamina por cromatografia de camada delgada (CCD). A metodologia de CCD utilizando este sistema de solventes tem potencialidade para uso em outros tipos de alimentos, além do pescado.

A quantificação de agmatina através desta metodologia deve ser feita com critério, uma vez que interferentes podem gerar valores de agmatina sobre-estimados. Este problema pode ter ocorrido na determinação de agmatina em bacalhau e hadoque.

A baixa recuperação das aminas biogênicas espermina, espermidina, triptamina e tiramina indica que a extração destas aminas deve ser aperfeiçoada.

Nenhum dos índices químicos testados foi adequado para avaliação do frescor de bacalhau (*G. morhua*) e hadoque (*M. aeglefinus*). Alterações mais significativas dos teores de bases nitrogenadas voláteis, trimetilamina, cadaverina e putrescina ocorreram a partir da segunda semana de armazenamento, caracterizando estes compostos como índices de deterioração.

BNV e triptofano livre foram considerados bons índices de frescor para lula (*I. coindetii*) e sépia (*S. officinalis*). Os aumentos contínuos de seus teores desde o início do armazenamento indicam que tais compostos são formados pela atividade enzimática endógena, principal responsável pelo decréscimo inicial do frescor em pescado.

Nenhuma das aminas biogênicas avaliadas foi útil como índice de qualidade em *S. officinalis*. Agmatina pode ser considerada um índice de deterioração para a lula *Illex coindetii*. Uréia e TMA podem ser consideradas índices de deterioração em *S.*

*officinalis*. O aumento significativo da TMA (% do NNP) em *I. coindetti* durante a primeira semana de armazenamento sugere sua possível utilidade como um índice de frescor para a espécie.

O decréscimo ( $p < 0,05$ ) do NNP no músculo das duas espécies de cefalópodes durante o armazenamento comprovou a existência de lixiviação. O efeito da lixiviação, que dificulta o acúmulo dos compostos solúveis no músculo, e diminui a utilidade de alguns índices de frescor, foi minimizado quando os teores dos diversos compostos foram expressos como % do NNP. Em pescado de tamanho pequeno ou em cefalópodes é imprescindível considerar o efeito da lixiviação ao sugerir limites máximos para os teores de compostos solúveis utilizados como índices de frescor.

## **ANEXO 1**

## New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid

Judite Lapa-Guimarães<sup>a,b,\*</sup>, Jana Pickova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences, P.O. Box 7031, 75007 Uppsala, Sweden

<sup>b</sup> Faculty of Food Engineering, State University of Campinas, P.O. Box 6121, 13083-970 Campinas, Brazil

Received 10 March 2004; received in revised form 7 June 2004; accepted 8 June 2004

### Abstract

Different solvent systems were evaluated for their ability to separate biogenic amines by thin-layer chromatography (TLC). Dansyl derivatives of agmatine, putrescine, tryptamine, cadaverine, spermidine, histamine, spermine, tyramine and  $\beta$ -phenylethylamine were separated using the solvent system chloroform–diethyl ether–triethylamine (6:4:1), followed by chloroform–triethylamine (6:1). After separation dansyl amines were quantified by fluorescence densitometry at 330 nm. Correlation coefficients of linear regressions were higher than 0.99 for all amines, except for agmatine (0.976). Detection limits were 10 ng for tryptamine, tyramine, histamine and  $\beta$ -phenylethylamine, and 5 ng for the other amines. The overall repeatability of the chromatography was 1.82% when including agmatine and barely 1.02% for the other amines. The accuracy ranged from 105.97% (agmatine) to 49.92% (tryptamine). This thin-layer chromatography method was found to be an effective and precise analytical procedure to separate and determine biogenic amines. Its main advantages compared to previous procedures are that it uses less harmful solvent (diethyl ether instead of benzene) and can separate a larger group of biogenic amines.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Fish; Food analysis; Biogenic amines

### 1. Introduction

Biogenic amines are organic bases of low molecular weight, which can be formed and degraded during the cellular metabolism in plants, animals and microorganisms [1]. Although biogenic amines are present in very low quantities in food, they can be formed during food storage. The major factors leading to their formation are probably availability of free amino acids and the presence of bacteria able to decarboxylate amino acids [2]. Although biogenic amines such as histamine, tyrosine and putrescine are needed for many essential functions in man and animals, consumption of food containing high amounts of these amines can have toxicological effects [1]. The limit for histamine content has been set at 10 mg per 100 g flesh in fish of the *Scom-*

*bridae* and *Clupeidae* families at the point of first sale in the European Union (EU) [3].

Of biogenic amines occurring in fish, shellfish and derived products, the most important are cadaverine, putrescine, tyramine, histamine, spermidine, spermine, agmatine and tryptamine. Studies have shown that the production of these amines is related to fish spoilage [4–8]. Because amines are produced by spoilage bacteria, which only appear in significant numbers towards the end of the shelf-life of a fish, their concentration are more likely to be valuable as indices of spoilage rather than of freshness [3]. However, agmatine was detected at an early stage of post-mortem storage of squid of the species *Todarodes pacificus* [9] and *Todaropsis eblanae* [10] and considered excellent as a freshness indicator. In hake (*Merluccius merluccius*) stored in ice, agmatine and cadaverine may indicate freshness since they were detected before spoilage [7].

Among the different techniques recommended for identification and quantification of biogenic amines, thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chro-

\* Corresponding author. Tel.: +46 18 671966; fax: +46 18 672995.

E-mail addresses: [judite.lapa.guimaraes@lmv.slu.se](mailto:judite.lapa.guimaraes@lmv.slu.se), [juditelapaguima@yahoo.com.br](mailto:juditelapaguima@yahoo.com.br) (J. Lapa-Guimarães).



matography (HPLC) have been the most useful. Recently, the development in the field of stationary phases for TLC and instruments for automated sample application and densitometric scan has made it possible to obtain results similar to those from HPLC. TLC has many advantages, including simplicity of operation; ability to repeat detection and quantification at any time with changed parameters because fractions representing the entire sample are stored on the plate; in-system calibration for quantitative analysis; and cost effectiveness since many samples can be analysed on a single plate with use of a low amount of solvent [11].

Amines are highly polar substances that tend to streak during the chromatographic development, limiting the resolution. They are usually determined after conversion to their derivatives, which have better properties than the free amines. The most common reagent used in the derivatisation of amines is dansyl chloride. It gives highly fluorescent sulphonamide derivatives with both primary and secondary amines that are relatively stable, have improved chromatographic properties and are readily isolated from the hydrolysis product, dansyl sulphonate, by solvent extraction [12]. Different conditions have been used for dansylation of amines, i.e., 1 h at temperatures higher than 40 °C [13–16] or longer periods at room temperature [4,12,17–20]. However, to our knowledge, the effect of these different conditions on the complete conversion of amines in their dansyl derivatives has not been studied.

The separation and quantification of dansyl amines by TLC, using one dimensional development technique seems to be limited to the separation of five [16] to eight [15] amines, depending on whether single or multiple development is used. Moreover, the separation of dansyl amines can often be adversely affected by ammonia derivatives [12,16,19,20]. Dansyl-ammonia peaks are often considered well-known artefacts of dansylation reaction or consequence of impurities present in standard or samples. Because the presence of ammonia in fish muscle and consequently in fish muscle extracts is practically unavoidably, the efficiency of the diverse solvent systems in separate the dansyl amines from dansyl-ammonia must be investigated.

Several solvent systems have been evaluated and used in amine derivatives separation by TLC, and benzene is commonly used [15,18,20] despite its high toxicity.

Although some studies concern the separation and estimation of agmatine derivatives by HPLC [2,3,12,19,21], there are no studies on the determination of dansyl-agmatine by TLC. Thus, the development of a solvent system based in solvents less harmful than benzene and effective in the separation of many different amines, including agmatine, occurring in fish, shellfish and derived products would be desirable.

The objectives of this study were to evaluate different solvent systems for their ability to separate biogenic amines, including agmatine, by thin-layer chromatography, and to evaluate some of the dansylation parameters.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and apparatus

The biogenic amines, agmatine sulphate (AGM), cadaverine dihydrochloride (CAD), putrescine dihydrochloride (PUT),  $\beta$ -phenylethylamine hydrochloride (PHE) and tyramine hydrochloride (TYR) as well as 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulphonyl (dansyl chloride) were obtained from Sigma-Aldrich, Steinheim (Germany). Histamine dihydrochloride (HIS), spermine tetrahydrochloride (SPM), spermidine trihydrochloride (SPD) and tryptamine hydrochloride (TRY) were obtained from Fluka, Steinheim (Germany). Thin-layer chromatography glass plates (20 cm  $\times$  20 cm and 10 cm  $\times$  20 cm precoated with 0.25 mm silica gel G60), high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) glass plates (10 cm  $\times$  20 cm precoated with 0.10 mm silica gel G60) and all other chemicals and solvents were purchased from E. Merck, Darmstadt (Germany).

An Automatic TLC sampler 4, twin trough chambers (21 cm  $\times$  21 cm  $\times$  6 cm) and a TLC scanner 3 programmed by Win CATS software from Camag Instruments, Muttenz (Switzerland) were used to perform the application of samples over the plate, amine separation and dansyl amines fluorescence detection, respectively.

### 2.2. Preparation of standards

Each amine stock standard and  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , as a source of ammonia (AMM), was prepared at a concentration of 2.0 mg/ml (free base) in 5% trichloroacetic acid (TCA) and refrigerated until required. The work standards (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were prepared by diluting 0.1 ml of the stock standards to 10 ml with 5% TCA. Mixtures of amines and AMM (range 0.25–50  $\mu\text{g}$  of each compound per ml) were prepared by mixing and diluting the stock standards with appropriate volumes of 5% TCA.

### 2.3. Analysis of amines in fish and squid samples

Cod (*Gadus morhua*) and squid (*Illex argentinus*) were obtained from a fish market and were the freshest available. At the laboratory fish filets and squid mantles were obtained and cut into pieces. Pieces of at least three fish or squid were packed in polyethylene bags and stored between ice layers. Samples were analysed immediately upon arrival at the laboratory and during storage to determine levels of biogenic amines. In each sampling the content of one bag (at least 50 g) was ground in a kitchen mixer. A 10 g ground sample was transferred to a Falcon tube and homogenised with 20 ml 5% TCA for 1 min using an Ultra-Turrax homogeniser. The homogenate was centrifuged (1200  $\times$  g, 4 min, 18 °C) and the extract filtered in filter paper. The precipitate was washed twice with 10 ml 5% TCA, centrifuged and filtered. The extracts were collected and diluted to 50 ml with 5% TCA in a volumetric flask.

#### 2.4. Study of solvent systems for separation of biogenic amines by TLC

##### 2.4.1. Dansylation of amines

Aliquots of 1 ml of work standards (20 µg) and mixture of standard amines and AMM (corresponding to 10 µg of each compound) were placed in test tubes and NaHCO<sub>3</sub> was added till saturation. Then, 1 ml of dansyl chloride (5 mg/ml in acetone) was added, using a Vortex mixer while adding the reagent. The tubes were closed and incubated at 40 °C for 1 h. After dansylation, 0.5 ml of 0.1 g/ml glycine solution was added to react with residual dansyl chloride. The content of tubes was mixed and tubes were heated at 40 °C for 20 min. The residual acetone was evaporated under a nitrogen stream. Water (3 ml) was added and dansyl amines were extracted with 3 × 2 ml diethyl ether, leaving the dansyl-glycine behind. The combined diethyl ether extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream and the residue was dissolved in 1 ml ethyl acetate. During this procedure, exposure to light was minimised.

##### 2.4.2. Separation of dansyl amines by TLC

Using an automated TLC sampler, 10 µl of ethyl acetate containing the dansyl amine standards were applied 2 cm from the base edge of the TLC plate in 5 mm bands at 1 cm intervals. The TLC plates were not submitted to any kind of pre-treatment or activation.

Five solvent systems were evaluated for their effectiveness in separation of amines using the single development technique, and four were tested using the double development technique (Table 1). In both developments the twin trough chamber was loaded with 25 ml of the solvent system in each trough and previously equilibrated with the solvent system using a saturation pad. After developments the plate was dried and scanned at wavelength of 330 nm. The fluorescence emission of dansyl amine bands was measured using a K400 optical filter. When the double development technique was used, the plate was developed in the first solvent system and after unforced drying and scanning, the

plate was developed in the same direction using the second solvent system.

Only the solvent systems 1E and 2D were evaluated for their abilities to separate PHE from the other biogenic amines.

##### 2.5. Study of optimal reaction time and temperature for amines dansylation

Aliquots of 1 ml of mixtures of standard amines and AMM (corresponding to 10 µg and 50 µg of each compound) were placed in test tubes and NaHCO<sub>3</sub> was added till saturation. Then, 1 ml of dansyl chloride (5 mg/ml in acetone) was added, using a Vortex mixer while adding the reagent. The tubes were closed and incubated in one of five different conditions for dansylation: 30 min, 1 h, 2 h at 40 °C, 1 h at 55 °C and 16 h at room temperature. After dansylation tubes were treated as described in Section 2.4.1. The dansyl amines were applied on the TLC plates as described in Section 2.4.2 and plates were developed in chloroform–diethyl ether–triethylamine (6:4:1) for 10 cm from the start position and subsequently in chloroform–triethylamine (6:1) for 17 cm.

##### 2.6. Linearity, precision and accuracy assays

After standardisation of dansylation and thin-layer chromatography conditions, assays were performed to determine linearity, precision and accuracy of the analytical procedure.

To determine the linearity of the proposed method standard curves for each amine were prepared within the range 0.25–50 µg/ml (eight calibration points). Standards in different concentrations were dansylated, applied on TLC plates (10 µl), separated by TLC and each dansyl amine band was densitometrically determined at 330 nm. Linear regressions, correlation coefficients, linearity range and detection limits were determined.

To determine the precision, i.e., repeatability of the analytical procedure, mixtures of amines and ammonia at

Table 1  
Solvent systems evaluated for their ability to separate biogenic amines

Single development–solvent system	Ratio	Double development–solvent system	Ratio
1A–Chloroform–triethylamine <sup>a</sup>	4:1	2A–1st chloroform–triethylamine 2nd diethyl ether–chloroform–acetone–triethylamine	4:1 4:6:1:1
1B–Cyclohexane–ethylacetate <sup>b</sup>	1:1	2B–1st cyclohexane–ethylacetate 2nd diethyl ether–acetone–triethylamine	1:1 10:2:1
1C–Chloroform–diethyl ether–triethylamine	6:4:1	2C–1st chloroform–diethyl ether–triethylamine 2nd diethyl ether: acetone: triethylamine	6:4:1 10:2:1
1D–Diethyl ether–acetone–triethylamine	10:2:1	2D–1st chloroform–diethyl ether–triethylamine 2nd chloroform–triethylamine	6:4:1 6:1
1E–Chloroform–diethyl ether–triethylamine	4:1:1		

<sup>a</sup> Shakila et al. [16].

<sup>b</sup> Benčík et al. [21].



concentrations of 5 µg/ml, 10 µg/ml and 20 µg/ml were analysed in triplicate. Averages, standard deviations (S.D.) and relative standard deviations (R.S.D.) were calculated.

Accuracy is the measure of exactness of an analytical method, or the closeness of agreement between the value that is accepted as true value or an accepted reference value and the value found. It is measured as the percent of analyte recovered by assay, by spiking samples in a blind study. To determine accuracy the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guideline on Methodology [22] recommends collecting data from at least nine determinations over at least three concentration levels covering the specified range (for example, three concentrations, three replicates each). Thus, to determine the method accuracy, a test of recovery of amines from samples was performed. Three different amounts of the mixtures of standard amines, corresponding to 0.25 mg, 0.50 mg and 1.00 mg, were added to 10 g of ground fresh fish and squid samples. Four samples were spiked for each standard concentration. Samples were extracted with 5% TCA as described in Section 2.3. Final concentrations of the added amines were 5 µg/ml, 10 µg/ml and 20 µg/ml extract. Recoveries of amines in each concentration were calculated by comparing areas of peaks obtained for spiked fish and squid extracts with those obtained for a standard solution of the same concentration.

### 2.7. Statistical analysis

Results were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey test was used to detect differences between means. This statistical analysis was performed using the Statistica software, version 6.0 (StatSoft, 1995, Tulsa, OK, USA) at a significance level of  $P < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Amines separation

The efficiency of the solvent system in separation of biogenic amines is shown in Table 2. The solvent system 1A (chloroform–triethylamine, 4:1) had been successfully used by Shakila et al. [16] to separate PUT, CAD, HIS, SPD and TYR. However, when TRY and SPM are present, interferences in the detection of PUT and TYR, respectively, were observed. The solvent system 1B (cyclohexane–ethyl acetate, 1:1) delayed the elution of HIS, SPM and SPD, which were well separated, but all amines ran slowly. AMM interfered in CAD detection and both were close to PUT. TRY and TYR were not resolved. This solvent system was used by Bencsik et al. [21] to purify dansyl-AGM through TLC. This is the only study dealing with isolation of dansyl-AGM by TLC and reports that dansyl-AGM was positioned near the start ( $R_F = 0.1$ ) after ascending development with the

Table 2  
 $R_F$  values of the amines and ammonia after single development using different solvent systems<sup>a</sup>

Biogenic amine/AMM	Retardation factor ( $R_F$ )				
	1A <sup>b</sup>	1B <sup>b</sup>	1C <sup>c</sup>	1D <sup>b</sup>	1E <sup>b</sup>
Agmatine	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ammonia	0.20	0.33	0.17	0.46	0.18
Cadaverine	0.47	0.32	0.25	0.36	0.31
Histamine	0.63	0.14	0.30	0.36	0.43
Putrescine	0.34	0.29	0.17	0.32	0.22
Spermidine	0.59	0.23	0.23	0.22	0.36
Spermine	0.73	0.18	0.30	0.16	0.50
Tryptamine	0.32	0.38	0.22	0.34	0.24
Tyramine	0.71	0.38	0.48	0.53	0.58
β-Phenylethylamine	ND	ND	ND	ND	0.66

ND: not determined.

<sup>a</sup> Codes at the head of each column refer to solvent systems used, as described in Table 1.

<sup>b</sup> The solvent system was allowed to ascend for 17 cm from the start position.

<sup>c</sup> The solvent system was allowed to ascend for 15 cm from the start position.

aforementioned solvent system using HPTLC plates. In the present study the dansyl-AGM remained at the start position even when the 1B solvent system was utilised jointly with HPTLC plates and in all other solvent systems evaluated as well. Using the solvent system 1C, AMM and PUT, as well as HIS and SPM were not separated, moreover, TRY, SPD and CAD remained close to each other. In the system 1D, only SPD, SPM and TYR were satisfactorily separated from the other dansyl amines. Of the solvent systems evaluated using the single development technique, the system 1E was the most effective for amine separation since only PUT and TYR were not well separated ( $R_F = 0.22$  and  $0.24$ , respectively).

Therefore, double development technique was used to achieve the amine separation by TLC, and the chromatograms are shown in Fig. 1. The system 2B represents the joint effect of systems 1B and 1D, which gave different effects in dansyl amine separation. SPM, SPD, HIS and TYR could be resolved without AMM interference, but CAD eluted together with TRY and close to PUT.

The system 2C was evaluated using a less harmful solvent as a replacement to benzene, one of the solvents utilised by Shalaby [15] to separate dansyl amines. Diethyl ether was chosen since its polarity (2.8) is similar to benzene polarity (2.7). Despite the high flammability of the diethyl ether, which requires caution, it can be regarded as a less harmful solvent in comparison with benzene. The development of the plate using the system 2C was carried out allowing the ascending of the solvents for 15 cm from the start position. The separation was inadequate and only TYR was separated from AMM and other amines.

Solvent systems 2A and 2D were based on the properties of the system chloroform–triethylamine (1A) which led to a good spread of the amines along the plate, and system

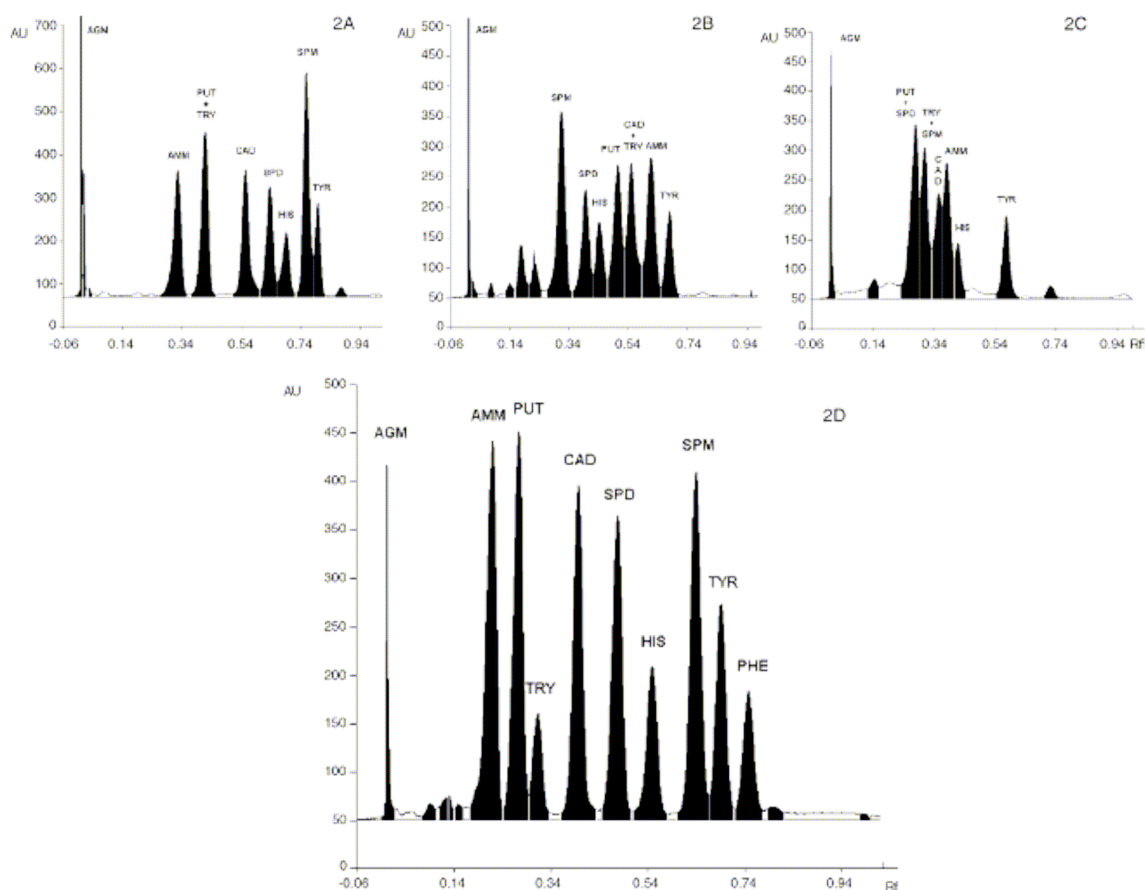


Fig. 1. Chromatogram of dansyl amines and dansyl-AMM after separation by thin-layer chromatography using double development technique. 2A, 2B, 2C and 2D are solvent systems as described in Table 1. Standards 20  $\mu\text{g/ml}$ –10  $\mu\text{l}$  (20 ng) applied. AGM: Agmatine; PUT: putrescine; TRY: tryptamine; CAD: cadaverine; SPD: spermidine; HIS: histamine; SPM: spermine; TYR: tyramine; PHE:  $\beta$ -phenylethylamine; AMM: ammonia.

1C which allowed the separation of TRY and PUT, and also SPM and TYR. In fact, the system 2A was effective in separation of SPM and TYR, but TRY and PUT remained unresolved. The system 2D was evaluated as an inversion of the sequence of solvent systems used in 2A since only system 1C was able to separate TRY and PUT and to place the others amines and AMM in a sequence that could later be well resolved by a solvent system such as chloroform–triethylamine. To obtain the best separation of amines the solvent system used during the first development was allowed to ascend on the plate for 10 cm from the start position and the solvent system used in the second development was chloroform–triethylamine, ratio 6:1. PUT, TRY, CAD, SPD, HIS, SPM, TYR and PHE were well separated, with good peak resolution and symmetry, without interference of AMM. AGM remained at the start position.

The permanence of AGM at the start position represents a serious problem for the determination of this amine by TLC

since the product of the dansyl chloride hydrolysis, dansyl sulphonate, also remains at the same position. The use of glycine to react with the remaining dansyl chloride and the posterior extraction with diethyl ether are essential to eliminate the excess of dansyl chloride and dansyl sulphonate, allowing the dansyl-AGM determination. However, in food or fish samples the existence of other substances can adversely affect dansyl-AGM determination by TLC.

### 3.2. Dansylation time and temperature

The effects of the temperature and duration parameters on the dansylation of the amines at concentrations of 10  $\mu\text{g/ml}$  and 50  $\mu\text{g/ml}$  are shown in Fig. 2. For AGM, SPD, SPM and TYR when dansylation was performed for low amounts of amine (10  $\mu\text{g/ml}$ ) peak areas were not affected by the different dansylation conditions. However, for PUT when dansylation was performed at room temperature for 16 h,

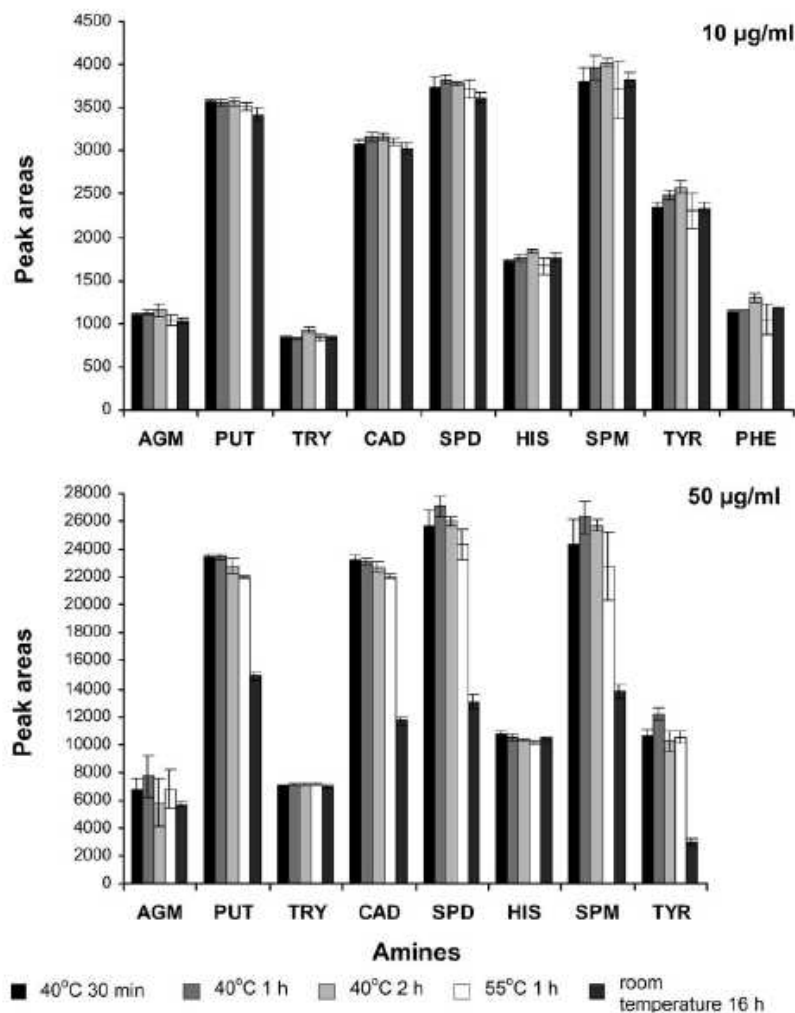


Fig. 2. Effect of temperature and duration of dansylation on the peak areas of dansyl amines. The results are presented as average value  $\pm$  standard deviation.  $\beta$ -phenylethylamine was not evaluated at 50  $\mu$ g/ml.

the peak area was significantly smaller ( $P < 0.05$ ) than for any other condition. For PHE and HIS dansylation at 40 °C for 2 h led to greater areas than at 55 °C for 1 h. For CAD dansylation at 40 °C for 1 or 2 h led to greater areas than at room temperature for 16 h, and for TRY dansylation at 40 °C for 2 h was the best condition.

For higher amounts of amines (50  $\mu$ g/ml), dansylation temperature and duration effected the formation of all dansyl amines, except AGM and TRY. Peak areas were significantly smaller ( $P < 0.05$ ) for PUT, CAD, SPD, SPM and TYR for dansylation at room temperature for 16 h than any other condition. Dansylation at 55 °C for 1 h led to smaller peak areas than 40 °C for 30 min and 1 h for PUT and CAD, and 40 °C for 1 h for SPD and TYR.

Because dansylation at higher temperatures (55 °C) or at room temperature during a longer period (16 h) was not advantageous, statistical analysis was performed for only the effect of the dansylation duration at 40 °C. Peak areas of the amine standards allowed to react with dansyl chloride for 30 min, 1 or 2 h differed only slightly. Significant differences between 30 min and 1 h of dansylation were found only for TYR (10  $\mu$ g and 50  $\mu$ g) and increases ( $P < 0.05$ ) in peak areas for 10  $\mu$ g of TRY, HIS and PHE were observed doubling the reaction time from 1 h to 2 h. Thus the statistical analysis showed that AGM, PUT, CAD, SPD, SPM were completely converted in their dansyl derivatives after 30 min; TYR after 1 h; and TRY, HIS and PHE after 2 h at 40 °C. Overall RSD for amines peak areas were



Table 3  
Linearity of the detector response at 330 nm and detection limits of the dansyl amines

Amine	Slope (S.D.) <sup>a</sup>	Intercept (S.D.) <sup>a</sup>	Correlation coefficient	Linearity range (µg/ml)	Detection limit (ng)
Agmatine	0.60 (0.08)	6.75 (1.36)	0.9762	0.5–50	5
Putrescine	5.82 (0.35)	2.56 (1.50)	0.9988	0.5–50	5
Tryptamine	1.69 (0.06)	5.40 (2.59)	0.9940	1.0–50	10
Cadaverine	5.60 (0.50)	8.03 (4.24)	0.9995	0.5–50	5
Spermidine	5.38 (0.30)	5.29 (2.91)	0.9992	0.5–50	5
Histamine	3.37 (0.30)	5.60 (0.50)	0.9980	1.0–50	10
Spermine	4.82 (0.04)	8.82 (2.45)	0.9997	0.5–50	5
Tyramine	3.15 (0.49)	3.72 (2.96)	0.9987	1.0–50	10
β-Phenylethylamine	2.11 (0.33)	3.46 (2.77)	0.9985	1.0–50	10

<sup>a</sup> Slope, intercept and standard deviation (S.D.) were multiplied by 10<sup>-2</sup>.

smaller for dansylation at 40 °C for 1 h (1.78% and 4.35% for 10 µg and 50 µg, respectively) than at 40 °C for 2 h (2.31% and 5.56% for 10 µg and 50 µg, respectively). These results indicate that the optimal condition for amines dansylation is at 40 °C for 1 h since better repeatability was obtained.

### 3.3. Linearity, precision and accuracy assays

The linearity of the method was determined after linear regression analysis of data obtained with standard curves of each amine. The correlation coefficients were higher than 0.99 for all amines, except for AGM (0.976), show-

Table 4  
Repeatability of the method for determination of dansyl amines by TLC, including dansylation and chromatography and only the chromatography step

Biogenic amine	Concentration evaluated (µg/ml)	Concentration detected (µg/ml)			
		Dansylation + chromatography		Chromatography	
		Average <sup>a</sup>	R.S.D. (%)	Average <sup>b</sup>	R.S.D. (%)
Agmatine	5	5.74	19.91	7.51	11.70
	10	12.79	9.62	7.47	8.63
	20	22.90	11.00	20.86	2.94
Putrescine	5	5.47	3.73	5.02	2.39
	10	10.68	2.85	10.80	0.65
	20	20.01	1.56	19.94	0.81
Tryptamine	5	5.35	4.49	4.99	2.04
	10	10.43	1.95	9.90	0.68
	20	19.84	0.99	19.69	2.23
Cadaverine	5	5.56	4.44	5.08	1.84
	10	10.53	2.34	10.85	1.28
	20	20.19	1.49	20.46	0.22
Spermidine	5	5.67	1.98	4.71	1.35
	10	10.42	0.76	10.12	0.10
	20	20.22	2.12	20.57	0.10
Histamine	5	6.34	7.83	4.88	1.40
	10	10.86	2.36	10.44	2.24
	20	21.59	3.84	19.57	1.72
Spermine	5	5.85	4.50	4.75	2.90
	10	10.36	1.23	10.11	0.13
	20	20.13	1.60	20.98	1.09
Tyramine	5	6.27	1.89	4.93	1.58
	10	10.73	3.54	10.42	1.23
	20	19.81	5.52	20.10	0.37
β-Phenylethylamine	5	6.29	7.76	4.50	3.63
	10	10.83	4.75	9.83	1.84
	20	21.77	4.16	19.14	1.89

R.S.D.: relative standard deviation.

<sup>a</sup> n = 4.

<sup>b</sup> n = 3.

ing that amine concentrations were linearly related with scanner responses (Table 3). The sensitivity of the method (fluorescent units per  $\mu\text{g}$  dansylated amine) can be determined by the relative fluorescence intensities of the dansyl amines obtained from the slopes of linear regressions. The detection limits varied with the relative fluorescence intensities and were 10 ng (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ –10  $\mu\text{l}$  applied) for TRY, TYR, HIS and PHE, and 5 ng (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ –10  $\mu\text{l}$  applied) for AGM, PUT, CAD, SPD and SPM. The fluorescence intensity can decrease with time due to light exposure and quenching by silica, causing a decrease in sensitivity. Thus, as it is usually recommended, standards should be applied along with samples in all TLC plates, making easy to correct any change in sensitivity by comparing the

samples and standards under the same chromatographic conditions.

The effect of dansylation and chromatographic separation on overall repeatability of the method was evaluated using three different concentrations of amines (Table 4). Generally higher R.S.D. were observed for the lower standard concentration (5  $\mu\text{g}$ ) than higher concentrations (10  $\mu\text{g}$  and 20  $\mu\text{g}$ ). When four samples of standards were dansylated and analysed separately, the higher R.S.D. was found for 5  $\mu\text{g}$  of AGM/ml (19.91%) and the lower R.S.D. for 10  $\mu\text{g}$  of SPD/ml (0.76%). The average value of repeatability for 10  $\mu\text{g}$  was 3.27% including AGM and 2.47% without AGM. As expected, lower R.S.D. were generally observed when the same dansylated standard was used for the chromatog-

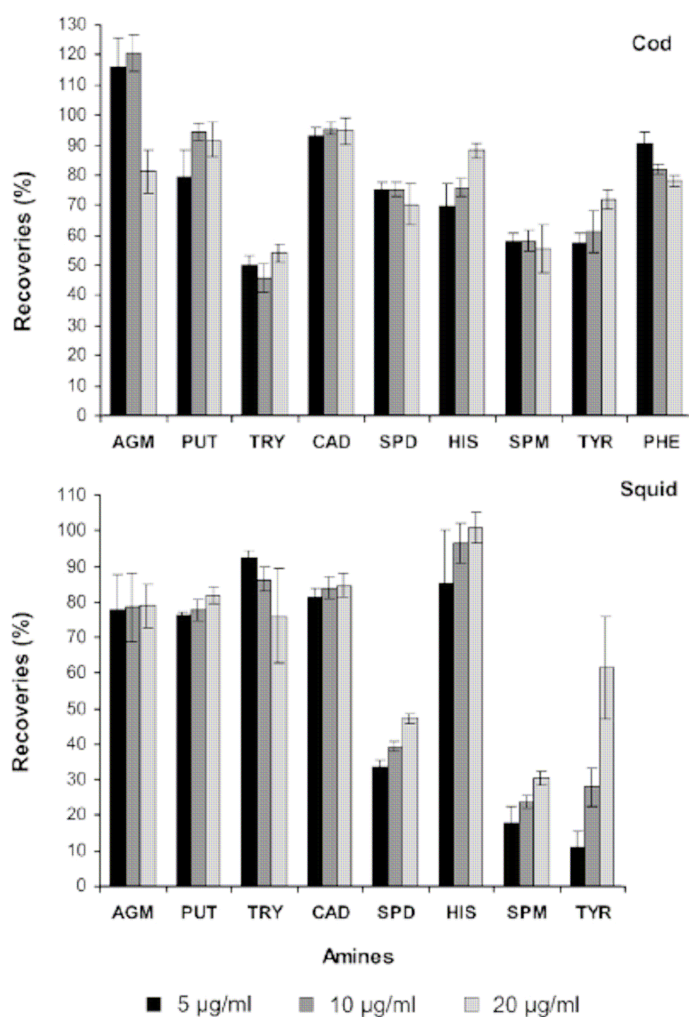


Fig. 3. Recoveries of amine standards added to cod (*Gadus morhua*) and squid (*Illex argentinus*). Three different concentrations were spiked and the final concentrations in extracts were 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The results are presented as average value  $\pm$  standard deviation.

Table 5  
Levels of biogenic amines in cod (*Gadus morhua*) and squid (*Illex argentinus*) during storage in ice

Sample	Biogenic amine (mg/100 g) <sup>a</sup>					
	AGM	PUT	CAD	HIS	SPM	TYR
<b>Cod</b>						
Day 1	nd	0.09 (0.06)	nd	nd	nd	nd
Day 15	nd	1.36 (0.27)	4.87 (0.35)	nd	nd	nd
Day 25	nd	2.33 (0.05)	11.38 (0.34)	7.19 (0.94)	0.25 (0.20)	nd
<b>Squid</b>						
Day 1	21.58 (1.19)	nd	6.73 (0.74)	nd	nd	nd
Day 5	28.15 (2.71)	nd	14.42 (0.79)	nd	nd	19.27 (1.15)
Day 15	42.77 (2.26)	59.9 (0.67)	32.06 (1.14)	nd	nd	65.86 (2.47)

AGM: Agmatine; PUT: putrescine; CAD: cadaverine; HIS: histamine; SPM: spermine; TYR: tyramine. Tryptamine, spermidine and  $\beta$ -phenylethylamine were not detected. nd: not detectable.

<sup>a</sup> Average (standard deviation).

raphy step three times. In this case, the higher R.S.D. was again found for 5  $\mu$ g of AGM/ml (11.70%) and the lower R.S.D. for 10  $\mu$ g and 20  $\mu$ g of SPD/ml (0.10%). The overall repeatability of the chromatography step, influenced only by sample application, TLC separation and automated peak detection was 1.82% when including AGM and barely 1.02% for the other amines, demonstrating the high precision of this analytical procedure step.

The percentages of recovery of standard amines added to fresh fish and squid samples differed depending on amine and species (Fig. 3). Also, for cod the recoveries significantly differed ( $P < 0.05$ ) for AGM, PUT, TRY, HIS, TYR and PHE, depending on the concentration of added standard (5, 10  $\mu$ g/ml and 20  $\mu$ g/ml), whereas for squid recoveries significantly differed for PUT, SPD, SPM and TYR. It was not possible to find out the occurrence of similar pattern in the literature since studies on recovery of amines [14,15,18,23] evaluate the recovery of only one amine concentration. Considering the average recovery of the three concentrations, for cod the highest recoveries were found for AGM (106.0%), CAD (94.4%), PUT (88.6%) and PHE (83.7%), intermediate recoveries for HIS (77.9%), SPD (73.5%) and TYR (63.6%) and lowest recoveries for TRY (49.9%) and SPM (57.4%). For squid the highest recoveries were found for HIS (94.3%), TRY (85.1%) and CAD (83.4%), intermediate recoveries for PUT and AGM (78.6% for both) and the lowest recoveries for SPD (40.2%), TYR (33.5%) and SPM (24.1%). Moret and Conte [14] and Hwang et al. [23] also observed considerable variation among the percentages of recovery of amines added to fish samples.

Studies have shown that TCA solution is the best solvent for extraction of amines from meat and meat products [24] and from fish muscle [14]. However, affinity between amine and protein matrix, and small differences in the extraction procedure (sample: TCA solution ratio, degree of homogenizing and protein precipitate separation) seem to drastically influence the amines partition and consequently the amine recoveries.

For AGM it is important to point out that the high percentage of recovery in cod, over 110% for 5  $\mu$ g/ml and 10  $\mu$ g/ml, may indicate that other substances present in the fish extract, which also remained at start position after TLC separation, can adversely affect AGM determination.

#### 3.4. Determination of amines in fish and squid samples

Levels of biogenic amines in cod and squid were determined during storage in ice to evaluate the applicability of the TLC method with the solvent system chloroform–diethyl ether–triethylamine (6:4:1) followed by chloroform–triethylamine (6:1) (Table 5). PUT was the only biogenic amine present in fresh cod and its levels progressively increased during storage. After 15 days of storage CAD was detected in higher levels than PUT. After 25 days of storage, when unequivocal signs of spoilage were observed in cod, SPM was detected in low concentration and CAD and HIS were present in high concentrations. Hernández-Herrero et al. [25] reported that the biogenic amine contents in gutted cod varied considerably during iced storage, and concluded that freshness indices based in these substances are not useful to evaluate quality of cod. The results obtained in the present study indicate that the contents of some biogenic amines in cod probably correlate with storage time, which deserves a further investigation. In squid AGM and CAD were detected in high concentrations as early as the first day and their concentrations increased during storage. TYR was observed from day 5. After 15 days of iced storage, when unequivocal signs of spoilage were observed in squid, PUT and TYR were determined in concentrations higher than 50 mg/100 g. This increase in AGM and CAD levels during the storage of squid (*I. argentinus*) indicates that these amines could be good quality indices for this squid species. AGM, CAD, PUT and TYR were also the main biogenic amines detected by Yamanaka et al. [9] after squid (*T. pacificus*) was stored 14 days at 0 °C, and the authors suggested AGM as good freshness index.

#### 4. Conclusion

One dimensional, double development technique, using the solvent system chloroform–diethyl ether–triethylamine (6:4:1) followed by chloroform–triethylamine (6:1) was found to be an effective and precise analytical procedure for separation and determination of the dansyl derivatives of AGM, PUT, TRY, CAD, SPD, HIS, SPM, TYR and PHE by TLC. Besides the advantages concerning costs, simplicity and versatility, the main advantages of this TLC methodology compared to previous procedures are that it uses a less harmful solvent (diethyl ether instead of benzene) and can separate nine biogenic amines. The use of this method for dansyl-AGM determination should be considered with caution, since substances present in sample extracts can cause interference, resulting in overestimated AGM values.

One dimensional, single development technique using the solvent system 1E (chloroform–diethyl ether–triethylamine, 4:1:1) can be a good and even simpler option for separation and determination of eight dansyl amines by TLC. The linearity, precision and accuracy of the TLC methodology using this solvent system, as well as the applicability of these procedures for determining amines in food in general, should be further investigated.

#### References

- [1] B. Brink, C. Damink, H.M.L.J. Joosten, J.H.J. Huis in't Veld, *Int. J. Food Microbiol.* 11 (1990) 73.
- [2] G. Yen, C. Hsieh, *J. Food Sci.* 56 (1991) 158.
- [3] I.M. Mackie, L. Pirie, A.H. Ritchie, H. Yamanaka, *Food Chem.* 60 (1997) 291.
- [4] J.L. Mierz, E. Karmas, *J. Food Sci.* 42 (1977) 155.
- [5] J. Fernández-Salguero, I.M. Mackie, *Int. J. Food Sci. Tech.* 22 (1987) 385.
- [6] H. Yamanaka, *J. Food Sci.* 54 (1989) 1133.
- [7] C. Ruiz-Capillas, A. Moral, *J. Food Sci.* 66 (2001) 1030.
- [8] K.A. Eliassen, R. Reistad, U. Risøen, H.F. Rønning, *Food Chem.* 78 (2002) 273.
- [9] H. Yamanaka, K. Shionoi, T. Kikuchi, *J. Food Sci.* 52 (1987) 936.
- [10] T. Pearup, J.A. Sanchez, A. Moral, H. Christensen, M. Bisgaard, L. Gram, *J. Appl. Microbiol.* 92 (2002) 941.
- [11] J. Sherma, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 129.
- [12] N.P.J. Price, J.L. Firmin, D.O. Gray, *J. Chromatogr.* 598 (1992) 51.
- [13] J. Rosier, C.V. Peterghen, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186 (1988) 28.
- [14] S. Moret, L.S. Conte, *J. Chromatogr. A* 729 (1966) 363.
- [15] A.R. Shalaby, *Food Chem.* 65 (1999) 117.
- [16] R.J. Shakila, T.S. Vasundhara, K.V. Kumudavally, *Food Chem.* 75 (2001) 255.
- [17] A.M. Spinelli, L. Lakritz, A.E. Wasserman, *J. Agric. Food Chem.* 22 (1974) 1026.
- [18] K.D. Henry Chin, P.E. Koehler, *J. Food Sci.* 48 (1983) 1826.
- [19] A.R. Hayman, D.O. Gray, S.V. Evans, *J. Chromatogr.* 325 (1985) 462.
- [20] N.P.J. Price, D.O. Gray, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 165.
- [21] K. Beucsik, T. Kremmer, M. Boldizsar, J. Tamás, M. Mák, E. Páldi, *J. Chromatogr. A* 824 (1988) 175.
- [22] International Conference on Harmonization, *Fed. Reg.* 62 (1997) 27463.
- [23] D. Hwang, S. Chang, C. Shihua, T. Chai, *J. Chromatogr. B* 693 (1997) 23.
- [24] J.A. Zee, R.E. Simard, L. L'Heureux, *J. Food Protect.* 46 (1983) 1044.
- [25] M.M. Hernández-Herrero, G. Duñós, P. Malle, S. Bouquélet, *J. Food Protect.* 65 (2002) 1152.