

DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO DA ADENOSINA TRIFOSFATO EM AMOSTRAS DE PESCADO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

DETERMINATION OF DEGRADATION PRODUCTS OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE IN SAMPLES OF FISH USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Sabrina da Costa Silva ANDRADE¹, Eliane Teixeira MÁRSICO², Ronoel Luiz de Oliveira GODOY³, Sidney PACHECO³

¹ Programa de Pós Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Faculdade de Veterinária – UFF.

² Departamento de Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Veterinária – UFF.

³ Embrapa Agroindústria de Alimentos

Palavras-chave: separação, nucleotídeos, pescado, CLAE.

Introdução

A degradação da Adenosina Trifosfato (ATP) pode refletir as primeiras alterações no pescado antes do crescimento bacteriano. Este processo inicia-se logo após a morte por ação de enzimas presentes no músculo originando, em sequência, as substâncias ADP – adenosina difosfato, AMP – adenosina monofosfato, IMP – inosina monofosfato, HxR – inosina; Hx – hipoxantina; X – xantina e U – ácido úrico (SAITO et al., 1959; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997; HUSS, 1999; VENUGOPAL, 2002).

A passagem de ATP a IMP é rápida, contudo, a transformação de IMP em Hx é mais demorada. Sendo assim, o IMP é acumulado na etapa inicial, fato que contribui para a definição do paladar do peixe, uma vez que este nucleotídeo é um importante componente relacionado ao sabor. Com o tempo, quando a qualidade do peixe decresce, verifica-se aumento dos níveis de hipoxantina e inosina (GRAM; HUSS, 1996; HUSS, 1999). A hipoxantina, formada pela decomposição autolítica de nucleotídeos ou por ação bacteriana, é um metabólito com efeito direto sobre o sabor amargo dos peixes em deterioração, portanto, seu conteúdo constitui um bom indicador do grau de frescor do peixe (GRAM; HUSS, 1996). Desta forma, o teor dos compostos formados a partir da degradação do ATP constitui um bom indicador da qualidade do pescado.

Diversos métodos têm sido descritos para análise dos produtos da degradação do ATP como colunas de troca cátion-iônica (SAITO et al. 1959), eletroforese capilar (LUONG et al., 1992) e biosensores (VENUGOPAL, 2002), porém a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o método de eleição, pois além de separar todos os compostos, permite a quantificação dos mesmos, conforme descrito por diversos autores (RYDER et al., 1985; VECIANA-NOGUÉS et al., 1997; VÁZQUEZ-ORTIZ et al., 1997; ÖZOGUL et al., 2000; VALLS-DELGADO, 2000; SIRIPATRAWAN et al., 2009; SONG et al., 2012).

O objetivo do presente estudo foi a otimização de uma metodologia para separação e identificação dos produtos da degradação do ATP em amostras de peixe baseada na cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.

Material e Métodos

A separação cromatográfica foi desenvolvida no cromatógrafo Waters® modelo Alliance® 2695 com detector de arranjo de fotodiodo Waters® 2996 utilizando-se uma coluna BDS Hypersil C₁₈, 2,4 µm, 100 x 4,6 mm Thermo® em forno a 30°C.

A fase móvel empregada foi constituída de fase A (0,04 M KH₂PO₄ e 0,06 M K₂HPO₄) com pH 7,0 e fase B (acetonitrila) e o gradiente de eluição foi programado, conforme descrito na Tabela 1. A análise foi monitorada por absorção Ultra Violeta (UV) a 254 nm. O volume de injeção foi de 5 µL.

Para a análise dos compostos, foram utilizadas amostras de peixe adquiridas diretamente de barcos pesqueiros e mantidas sob refrigeração em gelo (0±1°C). A extração

dos nucleotídeos, conforme metodologia utilizada por Andrade et al. (2012), foi realizada através da homogeneização de partes da porção muscular do peixe em gral com pistilo e posterior pesagem em duplicata de uma alíquota de 50 mg em balança analítica Marte® modelo AY220. A esta amostra foi adicionado 1 mL de ácido perclórico (HClO₄) a 8% seguida da homogeneização em agitador ultrassom Branson® modelo 2210 por um período de 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de hidróxido de potássio (KOH) 6M e homogeneizou-se em agitador mecânico Vortex-2 Genie durante 20 segundos. Após, centrifugou-se a 9000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para o vial com auxílio de um pipetador automático.

Os padrões adenosina monofosfato (pureza ≥ 99%), inosina monofosfato (pureza ≥ 98%), inosina (pureza ≥ 99%) e hipoxantina (pureza > 99%) da marca Sigma-Aldrich® foram preparados através da diluição de 10 mg em 0,5 mL de acetonitrila 1% e 0,5 mL de ácido fórmico 1%. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL ao qual foi adicionado água Milli-Q até completar o volume.

Tabela 1: Gradiente de eluição da fase móvel utilizado para separação cromatográfica dos produtos da degradação da adenosina trifosfato

Tempo (min.)	Solução Tampão (A) (%)	Acetonitrila (B) (%)	Fluxo (ml.min ⁻¹)
0	100	0	1,0
2	100	0	1,0
2,1	95	5	1,2
5	75	25	1,2
5,1	100	0	1,2
9,9	100	0	1,2
10	100	0	1,0

Resultados e Discussão

De acordo com o cromatograma apresentado na Figura 1, houve adequada separação dos padrões AMP, IMP, HxR e Hx com tempos de retenção em minutos de 2,18, 1,56, 5,85, 2,43, respectivamente. Nas amostras de peixe foi possível separar e identificar os quatro produtos da degradação da adenosina trifosfato estudados, conforme o cromatograma apresentado na Figura 2. Sugere-se que os picos não identificados neste cromatograma sejam a adenosina trifosfato e outro produto de sua degradação.

O tempo total de corrida cromatográfica foi de 12 minutos e os compostos analisados foram resolvidos em seis minutos. Esse tempo foi inferior ao obtido por Ryder et al. (1985) e Vázquez-Ortiz et al. (1997) que ao trabalharem em condições isocráticas com uma fase móvel constituída apenas de solução tampão e uma coluna com partículas de 10µm, obtiveram resolução dos compostos em 16 e 13 minutos de corrida cromatográfica, respectivamente. Veciana-Nógués et al. (1996) utilizaram uma coluna com partículas de 5µm e observaram que a adição de 30% de metanol à fase móvel após oito minutos de corrida, diminui o tempo de resolução dos compostos de 22 para 12 minutos, porém esse período ainda é superior ao obtido nesse estudo.

A adição de acetonitrila na fase móvel após dois minutos de corrida, conforme sugerido por Özogul et al. (2000), associado ao uso de coluna com tamanho de partículas de 2,4µm, auxiliou na diminuição do tempo de retenção dos compostos analisados. O tempo restante foi necessário para retomada das condições cromatográficas iniciais.

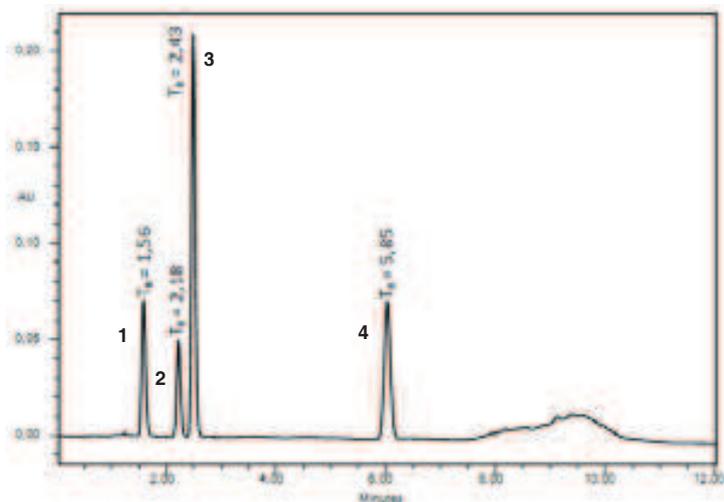


Figura 1: Cromatograma da mistura dos quatro padrões com os respectivos tempos de retenção: 1, inosina monofosfato; 2, adenosina monofosfato; 3, hipoxantina; 4, inosina.

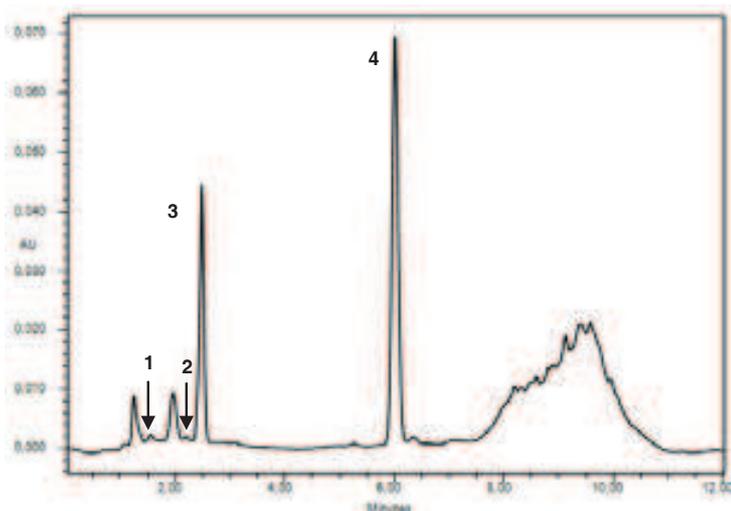


Figura 2: Cromatograma da amostra de peixe: 1, inosina monofosfato; 2, adenosina monofosfato; 3, hipoxantina; 4, inosina.

Conclusão

Através do método empregado foi possível separar e identificar os quatro produtos da degradação da adenosina trifosfato (AMP, IMP, HxR e Hx) analisados nesse estudo nas amostras de peixe. A utilização de coluna com partículas de 2,4 μm e a adição do solvente orgânico acetonitrila à fase móvel permitiram a diminuição no tempo de retenção das substâncias avaliadas, com consequente diminuição do tempo e custo de análise e menor quantidade de resíduo da fase móvel descartado.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, S. C. S.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; GODOY, R. L. O.; PACHECO, S.; QUEIROZ, M. F.; GUIMARÃES, C. F. M. **Validade comercial de sardinhas inteiras e refrigeradas avaliada por análises físico-químicas, bacteriológicas e sensorial.** Ciência Rural, v. 42, n. 10, p. 1901-1907, 2012.

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

HUIDOBRO, A.; PASTOR, A.; TEJADA, M. **Adenosine triphosphate and derivatives as freshness indicators of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)**. Food Science and Technology International, v. 7, n. 23, p. 23-30, 2001.

HUSS, H. H. **El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad**. Dinamarca: FAO, 1999.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; MASSON, C.; NGUYEN, A. L. **Hypoxanthine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes**. Journal of Food Science, v. 57, n. 1, p. 77-81, 1992.

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

RYDER, J. M. **Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography**. Journal Agriculture of Food Chemistry, v. 33, p. 678-680, 1985.

SAITO, T.; ARAI, K.; MATSUYOSHI, M. **A new method for estimating the freshness of fish**. Bulletin of the Japanese Society of Scientific, n. 24, p. 749-750, 1959.

SIRIPATRAWAN, U.; SANGUANDEEKUL, R.; NARAKAEW, V. **An alternative freshness index method for modified atmosphere packaged abalone using an artificial neural network**. Food Science and Technology, v. 42, p. 343-349, 2009.

SONG, Y.; LUO, Y.; YOU, J.; SHEN, H.; HU, S. **Biochemical, sensory and microbiological attributes of bream (*Megalobrama amblycephala*) during partial freezing and chilled storage**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 92, n. 1, p. 197-202, 2012.

VALLS, J. E.; DELGADO, A. B. **Evaluación de los productos de degradación del ATP en sardina (*Sardinella aurita*) durante su almacenamiento en hielo**. Revista Científica, v. X, n. 5, p. 383-390, 2000.

VÁZQUEZ-ORTIZ, F. A.; PACHECO-AGUILAR, R.; LUGO-SANCHEZ, M. E.; VILLEGAS-OZUNA, R. E. **Application of the freshness quality index (K value) for fresh fish to canned sardines from Northwestern México**. Journal of Food Composition and Analysis, v. 10, p. 158-165, 1997.

VECIANA-NOGUÉS, M. T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M. C. **Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC**. Food Chemistry, v. 59, n. 3, p. 467-472, 1997.

VENUGOPAL, V. **Biosensors in fish production and quality control**. Biosensors & Bioelectronics, v. 17, p. 147-157, 2002.

Autor a ser contactado: Sabrina da Costa Silva Andrade. Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Rua Vital Brazil Filho, 64 – Santa Rosa – Niterói – RJ, CEP: 24346-090. Email: sabrina.vet@gmail.com