

EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL ATP EN SARDINA (*Sardinella aurita*) DURANTE SU ALMACENAMIENTO EN HIELO

Evaluation of ATP Degradation Products in Sardine (*Sardinella aurita*) During Ice Storage

Jaime E. Valls y Alejandra B. Delgado

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 47097 Caracas 1041-A. Caracas, Venezuela. E-mail: vallsj@buho.ciens.ucv.ve.

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron en tres lotes de sardinas (*Sardinella aurita*), los cambios autolíticos producidos por la descomposición del adenosín trifosfato (ATP), en sus productos de degradación: adenosín difosfato (ADP), adenosín monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (INO) e hipoxantina (Hx). Cada uno de estos lotes fueron almacenados y refrigerados en cavas isotérmicas con hielo (4°C) bajo dos condiciones: enteras y evisceradas-descabezadas durante un período de 20 d. La extracción de los derivados del ATP fue realizada con ácido perclórico y la cuantificación, por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando un sistema isocrático con buffer fosfato, longitud de onda de detector de 254 nm y una columna C-18 de fase reversa para la separación de los compuestos de degradación del ATP. En ninguno de los tres lotes se detectaron cantidades apreciables de ATP, mientras que se cuantificaron cantidades bajas de ADP en algunas de las muestras (<0,04 µmol/g). Los niveles de AMP se mantuvieron durante todo el almacenamiento en cantidades inferiores a 0,25 µmol/g y no se observaron mayores variaciones a lo largo del estudio. El IMP inicial varió desde 4,7 hasta 5,8 µmol/g, degradándose más rápido a los 3-6 d. La INO aumentó hasta el día 6, para alcanzar valores superiores a 2 µmol/g a los 16 d de almacenamiento. El análisis de varianza aplicado a los niveles de INO indica la influencia de la época de captura (P<0,05). La Hx en los tres lotes mostró un comportamiento similar y no se encontraron diferencias significativas entre lotes (P<0,05). El valor K (10-21%) indica una materia prima con alto grado de frescura, alcanzando valores superiores al 42% entre los 9-13 d. El patrón de de-

gradación indica que *sardinella aurita* es una especie formadora de INO.

Palabras clave: Productos de degradación del ATP, sardina, cromatografía líquida.

ABSTRACT

The present study evaluated in three lots of sardines (*Sardinella aurita*), the autolytic changes of adenosine triphosphate (ATP) in their catabolites: adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), inosine monophosphate (IMP), inosine (INO) and hypoxanthine (Hx). Each one was stored under refrigeration in an isothermic box with ice (4°C) under two conditions: whole and eviscerated-behead for 20 days. The ATP extraction derivatives was performed with perchloric acid solution and the quantification was made with high performed liquid chromatography (HPLC), an isocratic elution system with phosphate buffer was used, wavelength detector was set at 254 nm and C-18 reversed phase column was employed for the separation of ATP related compounds. No significant ATP levels were detected in the three lots, meanwhile ADP was measured in some samples in low level (<0.04 µmol/g). AMP was kept under 0.25 µmol/g, and there were not variations observed along this experience. The initial IMP concentration changed from 4.7 to 5.8 µmol/g and its degradation was more rapid at 3-6 days. INO increased until 6th day, and finally at 16 storage days reached more than 2 µmol/g. Analysis of variance to INO levels showed the effect of catching period (P<0.05). In all lots Hx had a similar pathway and was found no significant differences between lots (P<0.05). Initial K value (10-21%) showed a very fresh raw material, that reached between 9-13 days more than 42%.

The present data indicates that sardinella aurita is an INO producer.

Key words: ATP degradation products, sardine, liquid chromatography.

INTRODUCCIÓN

El adenosín trifosfato (ATP) es una molécula de alta energía que permite mantener separados los filamentos musculares de actina y miosina en el tejido muscular. Cuando un organismo está vivo el ATP es regenerado a partir del ADP mediante reacciones de fosforilización oxidativa. Después de la muerte del animal, las células continúan durante un período determinado de tiempo, sus procesos fisiológicos normales, a medida que disminuye el contenido de oxígeno y se ha consumido la reserva de creatina fosfato, se detiene la regeneración del ATP y este es degradado rápidamente por medio de una serie de reacciones de defosforilación y desaminación a diferentes compuestos conocidos como productos de la degradación del ATP [1, 7, 20]. La secuencia de degradación es la siguiente: el ATP se degrada a adenosín difosfato (ADP) y seguidamente en adenosín monofosfato (AMP), a continuación una desaminasa hidroliza el grupo amino de la molécula y produce inosina monofosfato (IMP), la cual por acción de otra enzima forma inosina (INO), que a su vez se descompone en hipoxantina (Hx) y ribosa. La degradación del ATP ocurre de manera autolítica y es indicadora del avance del deterioro de la calidad del pescado o mariscos en sus primeras etapas de almacenamiento [1, 22]. Para la determinación de nucleótidos se emplean técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual permite su evaluación simultánea y estudiar sus cambios en función de un tiempo de almacenamiento o de un procesamiento. A través de esta metodología han sido estudiados diferentes productos acuícolas tales como: "hoki" (*Macrurus novaezealandiae*) [17, 18], trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) [11], pargo (*Pagrus auratus*) [12], atún (*Thunnus alalunga*), (*Thunnus albacores*) [16, 23], salmón (*Salmo salar*) [2] y platija (*Paralichthys olivaceus*) [8, 9].

La determinación de Hx se emplea en algunos casos como criterio de frescura dentro de una misma especie, pero no puede aplicarse entre especies ya que algunas forman INO, a mayor velocidad y otras, Hx. Buscando una expresión que refleje de manera más satisfactoria la calidad de un pescado, se ha propuesto el valor K, el cual es una relación de la suma de INO y Hx con respecto a la suma total de los nucleótidos. Los resultados de este índice se expresan en porcentaje, por ejemplo: en pescado fresco tiene valores bajos (<20%) y a medida que avanza el deterioro aumentan a una velocidad que depende de la especie [1, 7].

$$K (\%) = \frac{\text{INO} + \text{Hx}}{\text{INO} + \text{Hx} + \text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP}}$$

En base al patrón de degradación las especies evaluadas se pueden clasificar en 3 grupos: 1) Los que acumulan INO; 2) Los que acumulan Hx y; 3) Los que son intermedias entre los patrones anteriores. Los grupos 1 y 3 representan aproximadamente 2/3 del total de pescado estudiado, lo cual implica que el valor K ser un mejor índice, como parámetro de frescura, que la determinación exclusiva de Hx [4]. La determinación del patrón de degradación de nucleótidos en sardina tiene una gran importancia, ya que presenta los mayores volúmenes de captura entre todos los productos acuícolas en Venezuela, reportándose 138.780 TM para 1997. De este volumen total, aproximadamente un 15% se comercializa en estado fresco para consumo directo [14, 19].

Los objetivos del presente trabajo son: 1) Evaluar el patrón de degradación de los nucleótidos en muestras de sardina (*Sardinella aurita*) en refrigeración y 2) Determinar la posible influencia que las condiciones de procesamiento (enteras-evisceradas) y época del año, tienen sobre estos compuestos y el valor K.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Para la realización de este trabajo se utilizaron ejemplares de sardinas (*Sardinella aurita*), suministradas por la Compañía Anónima Industrial de Pesca (CAIP), localizada en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Las mismas provenían de las islas de Coche y Cubagua. Para el momento de la toma de muestra tenían entre 5-8h de capturadas y habían sido mantenidas con abundante hielo en las embarcaciones de la empresa. Se analizaron tres (3) lotes de sardinas capturadas en meses diferentes (junio, julio y noviembre), cada uno de aproximadamente 16kg, los mismos fueron trasladados en cavas con hielo por vía terrestre, en un tiempo de 5-6 h, hacia el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Cada lote fue dividido y almacenado bajo dos condiciones: enteras (EN) y evisceradas-descabezadas (EV), en cajas isotérmicas con hielo (4°C) en la proporción 2:1 y colocados en nevera a 7±1°C por un período de 20 d. El hielo se repuso cada 2-3 d y el agua del deshielo fue descartada, manteniendo las condiciones iniciales. Para evaluar la degradación del ATP se tomaron muestras del músculo dorsal de 5 ejemplares a 0, 1, 2, 3, 6, 9, 13, 16 y 20 d de almacenamiento, para cada una de las condiciones y lotes. El tejido muscular fue mezclado en una licuadora de uso doméstico (Osterizer, modelo 438-08) hasta obtener una mezcla homogeneizada.

Extracción de nucleótidos en las muestras

La extracción de los nucleótidos de las muestras se basó en las metodologías reportadas en la literatura [8, 17, 23, 25]. Las determinaciones se realizaron por triplicado, según el siguiente procedimiento: 5 g del músculo dorsal homogeneiza-

do fueron agregados a 10 mL de ácido perclórico (HClO_4) al 10% (Mallinckrodt Inc, Paris, KY). Se homogeneizó por 3-4 min a 12.000 rpm (ACE, Homogenizer, Mod: AM-3, Nihonseiki Kaisha, LTD, Japón) y la mezcla centrifugada a 4000 rpm durante 10 min a -10°C , en una centrífuga Sorvall, Modelo RC2-B con un rotor SS-34 (Sorvall, Wilmington, DE). El precipitado fue descartado y al sobrenadante se le ajustó su pH entre 6-7, con solución de hidróxido de potasio (KOH) al 50% (Riedel-de Haen A.G. Alemania), a continuación se filtró con papel Whatman cualitativo N°4 (Whatman Maidstone Kent, Reino Unido) y recolectado el líquido de filtrado en un balón de 50 mL. El precipitado (perclorato de potasio) contenido en el papel de filtro fue lavado con porciones de 4-5 mL agua destilada hasta completar el volumen de balón. Los extractos fueron almacenados a -40°C en recipientes de polietileno, hasta su cuantificación por cromatografía líquida, realizando una dilución de una alícuota de 5 mL a 50 mL.

Preparación de los estándares de nucleótidos

Se prepararon estándares de las sales sódicas de cada uno de los nucleótidos: ATP, ADP, AMP, IMP, Hx e INO (Sigma, St. Louis, MO), por dilución en 100 mL de agua destilada desionizada a una resistividad de 18 megaohm-cm (Water I. Arbor MICH). Las concentraciones de estas soluciones (base libre) fueron de 500 ppm para: ATP, ADP, AMP, IMP, INO y 200 ppm para Hx. Para obtener un estándar múltiple se mezclaron: 4 mL de ATP y ADP, 2 mL de AMP, IMP e INO y 1 mL de Hx, con 10 mL de ácido perclórico al 20% y se siguió el procedimiento ya señalado para la extracción de muestras, efectuando solo una dilución a 50 mL con agua destilada y desionizada. La concentración final fue de 40 ppm para ATP y ADP, 20 ppm para AMP, IMP e INO, y 4 ppm para Hx. El estándar múltiple fue almacenado en un recipiente de polietileno a una temperatura de -40°C , para su utilización como patrón de cuantificación de los nucleótidos extraídos de las muestras de sardinas.

Equipo y condiciones cromatográficas

Fue utilizado un equipo Waters compuesto por: bomba modelo 510; Inyector U6K; Detector UV-visible modelo 486, empleando una longitud de onda 254 nm y 0,5 AUFs; Integrador-registrador modelo 746 para procesar los datos, con una atenuación de 8, y columna Novapak C18 fase reversa (4 μ , 150x3,9 mm, d.i., Waters). Las condiciones cromatográficas se basaron en las reportadas en la literatura [8, 17, 23, 25], empleando: fase móvil buffer KH_2PO_4 (0,01M) y KCl (0,001 M), (Riedel-de Haen A.G. Alemania) pH 4,3. Flujo: 0,4 mL/min. De los extractos de las muestras y del estándar múltiple, se inyectaron 25 microlitros.

Análisis estadístico

El diseño experimental utilizado fue el diseño factorial 3x2x9, siendo los factores: época del año (lote I, II y III), condición (EN y EV) y tiempo de almacenamiento (0, 1, 2, 3, 6, 9, 13, 16 y 20 d). Las variables dependientes analizadas fueron

las concentraciones de ATP, ADP, AMP, IMP, Hx e INO, en muestras evaluadas por triplicado.

A los datos obtenidos se aplicó un análisis de varianza en un arreglo factorial de tratamiento utilizando una prueba de Tukey con el programa Stat-Graphyics versión 6.0 [21].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las TABLAS I, II y III pueden observarse los valores iniciales de los nucleótidos en sardinas bajo las condiciones enteras (EN) y evisceradas-descabezadas (EV), almacenadas por 20 d en hielo para los tres lotes.

No se detectaron niveles de ATP en ninguno de los tres lotes, mientras que el ADP se presentó en cantidades bajas (<0,28 $\mu\text{mol/g}$) e inclusive en algunas determinaciones no fue cuantificado. La degradación del ATP es muy rápida, después de la muerte del animal, así por ejemplo; en salmón cultivado (*Salmo salar*), disminuye en ejemplares recién sacrificados, desde 7,3 $\mu\text{mol/g}$ hasta 0,14 $\mu\text{mol/g}$ después de 8 h en hielo [24] y en sardinas (*Sardinops melanosticta*) recién sacrificadas, el contenido inicial de ATP varió de 5-10 <1 $\mu\text{mol/g}$ a 1-2 $\mu\text{mol/g}$ después de un almacenamiento en hielo por 8 h [25]. En estado vivo el contenido total de nucleótidos es de 4-9 $\mu\text{mol/g}$ en el músculo en reposo, constituidos principalmente por ATP, pero durante la captura disminuye en forma rápida, como consecuencia del agotamiento por contracciones musculares intensas, lo cual ocasiona que en pescados recién capturados, las concentraciones de ATP se pueden presentar en cantidades <1 $\mu\text{mol/g}$ muy bajas [22]. ATP, ADP y AMP generalmente disminuyen entre 24-48 h por lo cuál solo son detectados en ejemplares recién sacrificados, que han sido rápidamente procesados para la extracción de sus nucleótidos [10].

Para AMP, IMP Hx e INO se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre lotes, en relación a la época de captura, razón por la cual se analiza por separado cada nucleótido, mientras que las condiciones de EN y EV, para un mismo lote no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

El AMP para EN y EV se determinó en niveles inferiores a los 0,24 $\mu\text{mol/g}$, sin observarse mayores variaciones durante el periodo de estudio. Estas bajas cantidades pueden explicarse en base a la rápida degradación de: ATP, ADP y AMP como resultado de la forma de captura de la sardina, que es efectuada por medio de red o "chinchorro sardinero" [3]. Valores similares de AMP han sido señalados en otros estudios, en los cuales se cuantificó en cantidades menores a 1 $\mu\text{mol/g}$ [13, 23]. La hidrólisis del ATP hasta IMP es rápida, comparada con la hidrólisis del IMP a INO, de manera que el IMP tiende a acumularse en el músculo, ocasionando que el pescado para consumo del público, generalmente presente este nucleótido como mayoritario [23].

El IMP inicial correspondió a 4,69 $\mu\text{mol/g}$ (lote I), 5,39 $\mu\text{mol/g}$ (lote II) y 5,75 $\mu\text{mol/g}$ (lote III), lo que evidencia una rá-

TABLE I
 DEGRADACIÓN DE NUCLEÓTIDOS Y VALOR K DE SARDINAS ENTERAS (EN) Y EVISCERADAS (EV) SOMETIDAS A REFRIGERACIÓN (LOTE I)

| ATP | | ADP | | IMP | | Hx | | AMP | | INO | | %K | |
|-----|----|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Día | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV |
| 0 | ND | ND | 4,69±0,03 | 4,69±0,03 | 1,23±0,39 | 1,23±0,39 | 0,19±0,01 | 0,19±0,01 | 0,08±0,04 | 0,08±0,04 | 0,08±0,04 | 21,2±0,4 | 21,2±0,4 |
| 1 | ND | 0,15±0,1 | 4,89±0,41 | 4,89±0,41 | 0,11±0,09 | 0,11±0,09 | 0,12±0,05 | 0,12±0,05 | 0,67±0,03 | 0,67±0,03 | 0,67±0,03 | 13,1±0,4 | 13,1±0,4 |
| 2 | ND | 0,06±0,04 | 4,59±0,47 | 4,68±0,43 | 0,31±0,11 | 0,28±0,02 | 0,11±0,01 | 0,09±0,03 | 1,24±0,09 | 1,24±0,09 | 1,00±0,07 | 24,5±0,5 | 21,1±0,4 |
| 3 | ND | 0,04±0,02 | 4,39±0,10 | 4,29±0,34 | 0,50±0,14 | 0,81±0,54 | 0,12±0,01 | 0,16±0,08 | 1,48±0,06 | 1,48±0,06 | 1,18±0,19 | 30,4±0,1 | 30,9±0,3 |
| 6 | ND | 0,02±0,01 | 3,19±0,28 | 3,73±0,26 | 0,65±0,23 | 0,34±0,08 | 0,13±0,02 | 0,12±0,02 | 1,62±0,68 | 1,62±0,68 | 1,82±0,09 | 40,4±0,7 | 35,6±0,3 |
| 9 | ND | 0,05±0,01 | 2,40±0,11 | 2,53±0,04 | 0,86±0,20 | 0,850±0,20 | 0,17±0,03 | 0,15±0,02 | 1,97±0,58 | 1,97±0,58 | 1,91±0,05 | 52,0±0,6 | 50,8±0,2 |
| 13 | ND | 0,03±0,02 | 1,70±0,06 | 1,71±0,19 | 0,39±0,09 | 0,28±0,01 | 0,20±0,15 | 0,17±0,10 | 2,34±0,17 | 2,34±0,17 | 2,47±0,10 | 58,5±0,2 | 58,9±0,2 |
| 16 | ND | 0,03±0,02 | 1,05±0,07 | 1,46±0,22 | 0,88±0,1 | 0,46±0,05 | 0,24±0,22 | 0,18±0,04 | 2,75±0,04 | 2,75±0,04 | 2,55±0,09 | 73,3±0,2 | 64,0±0,2 |
| 20 | ND | 0,05±0,02 | 0,22±0,07 | 0,28±0,12 | 0,59±0,27 | 0,40±0,05 | 0,11±0,02 | 0,17±0,06 | 2,23±0,36 | 2,23±0,36 | 2,33±0,12 | 88,3±0,4 | 85,9±0,1 |

ND: No detectado. Límite detección ATP (7,4 ppm). ADP (6,2 ppm) (Referido a muestra de sardina). DE: Desviación estándar.

TABLE II
 DEGRADACIÓN DE NUCLEÓTIDOS Y VALOR K DE SARDINAS ENTERAS (EN) Y EVISCERADAS (EV) SOMETIDAS A REFRIGERACIÓN (LOTE II)

| ATP | | ADP | | IMP | | Hx | | AMP | | INO | | %K | |
|-----|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Día | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV |
| 0 | ND | ND | 5,39±0,23 | 5,39±0,23 | 0,24±0,17 | 0,24±0,17 | 0,13±0,01 | 0,13±0,01 | 0,79±0,04 | 0,79±0,04 | 0,79±0,04 | 15,7±0,2 | 15,7±0,2 |
| 1 | ND | 0,04±0,01 | 4,77±0,25 | 4,77±0,25 | 0,13±0,03 | 0,13±0,03 | 0,14±0,02 | 0,14±0,02 | 0,96±0,11 | 0,96±0,11 | 0,96±0,11 | 17,9±0,2 | 17,9±0,2 |
| 2 | ND | ND | 5,16±0,55 | 5,59±0,58 | 0,05±0,01 | 0,38±0,15 | 0,16±0,02 | 0,11±0,01 | 0,93±0,08 | 0,93±0,08 | 1,56±0,24 | 15,7±0,6 | 25,4±0,6 |
| 3 | ND | ND | 4,46±0,37 | 4,83±0,38 | 0,12±0,01 | 0,37±0,14 | 0,14±0,01 | 0,10±0,01 | 1,42±0,08 | 1,42±0,08 | 1,71±0,20 | 25,1±0,4 | 30,0±0,4 |
| 6 | ND | 0,04±0,01 | 3,77±0,20 | 4,07±0,19 | 0,19±0,02 | 0,36±0,13 | 0,12±0,01 | 0,09±0,01 | 1,90±0,09 | 1,90±0,09 | 1,86±0,16 | 34,7±0,2 | 34,8±0,2 |
| 9 | ND | ND | 3,40±0,13 | 3,18±0,20 | 0,35±0,03 | 0,39±0,11 | 0,10±0,01 | 0,09±0,01 | 2,21±0,06 | 2,21±0,06 | 2,52±0,42 | 42,3±0,1 | 47,1±0,4 |
| 13 | ND | ND | 3,02±0,07 | 2,30±0,22 | 0,51±0,05 | 0,42±0,09 | 0,08±0,01 | 0,09±0,01 | 2,52±0,04 | 2,52±0,04 | 3,18±0,68 | 49,4±0,1 | 60,2±0,7 |
| 16 | ND | ND | 1,21±0,05 | 1,04±0,09 | 0,43±0,05 | 0,65±0,06 | 0,16±0,13 | 0,23±0,01 | 2,38±0,04 | 2,38±0,04 | 2,58±0,55 | 67,3±0,1 | 71,8±0,6 |
| 20 | ND | ND | 1,12±0,19 | 0,63±0,11 | 0,91±0,06 | 0,67±0,04 | 0,13±0,09 | 0,11±0,04 | 2,67±0,11 | 2,67±0,11 | 2,98±0,07 | 80,1±0,2 | 83,3±0,1 |

ND: No detectado. Límite detección ATP (7,4 ppm). ADP (6,2 ppm) (Referido a muestra de sardina). DE: Desviación estándar.

DEGRADACIÓN DE NUCLEÓTIDOS Y VALOR K DE SARDINAS ENTERAS (EN) Y EVISCERADAS (EV) SOMETIDAS A REFRIGERACIÓN. (LOTE III)

Nucleótidos (µmol/g ± DE)

| Día | ATP | | ADP | | IMP | | Hx | | AMP | | INO | | %K | |
|-----|-----|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV | EN | EV |
| 0 | ND | ND | 0,28±0,01 | 0,28±0,01 | 5,75±0,25 | 5,75±0,25 | 0,08±0,03 | 0,08±0,03 | 0,170,02 | 0,17±0,02 | 0,67±0,07 | 0,67±0,07 | 10,8±0,3 | 10,8±0,3 |
| 1 | ND | ND | ND | ND | 5,52±0,64 | 5,52±0,64 | 0,54±0,04 | 0,54±0,04 | 0,15±0,01 | 0,15±0,01 | 1,05±0,01 | 1,05±0,01 | 21,9±0,6 | 21,9±0,6 |
| 2 | ND | ND | ND | ND | 4,22±0,70 | 4,52±0,91 | 0,13±0,04 | 0,22±0,06 | 0,15±0,03 | 0,10±0,02 | 1,26±0,20 | 1,11±0,18 | 24,1±0,7 | 22,4±0,9 |
| 3 | ND | ND | ND | ND | 4,53±0,41 | 3,25±0,52 | 0,29±0,15 | 0,20±0,04 | 0,14±0,03 | 0,12±0,01 | 1,49±0,19 | 1,40±0,10 | 27,6±0,4 | 32,2±0,5 |
| 6 | ND | ND | ND | ND | 2,99±0,08 | 1,97±0,13 | 0,18±0,01 | 0,18±0,03 | 0,14±0,01 | 0,14±0,01 | 1,40±0,07 | 1,69±0,03 | 33,5±0,1 | 47,0±0,1 |
| 9 | ND | ND | 0,05±0,01 | ND | 1,90±0,31 | 0,50±0,28 | 0,43±0,16 | 0,35±0,04 | 0,11±0,01 | 0,13±0,02 | 1,91±0,24 | 1,87±0,09 | 53,1±0,3 | 77,8±0,3 |
| 13 | ND | ND | ND | ND | 0,04±0,01 | 0,05±0,01 | 0,67±0,13 | 0,37±0,13 | 0,13±0,01 | 0,13±0,04 | 2,26±0,04 | 1,32±0,12 | 94,5±0,1 | 90,1±0,1 |
| 16 | ND | ND | 0,03±0,02 | ND | 0,40±0,04 | 0,08±0,01 | 0,61±0,01 | 0,62±0,25 | 0,11±0,03 | 0,05±0,03 | 2,65±0,10 | 2,32±0,12 | 85,7±0,1 | 95,9±0,3 |
| 20 | ND | ND | ND | ND | 0,25±0,07 | 0,26±0,16 | 0,87±0,03 | 0,36±0,03 | 0,06±0,04 | 0,06±0,01 | 0,66±0,03 | 0,57±0,02 | 82,8±0,1 | 74,5±0,2 |

ND: No detectado. L: límite detección ATP (7,4 ppm), ADP (6,2 ppm) (Referido a muestra de sardina). DE: Desviación estándar.

vida defosforilación y desaminación por parte del ATP. En el lote I los niveles iniciales permanecieron sin mayor variación hasta aproximadamente el tercer día. A partir del sexto día disminuyeron a 3,19 $\mu\text{mol/g}$ (EN) y 3,73 $\mu\text{mol/g}$ (EV), mientras que al final del estudio, se obtuvieron valores de 0,22 $\mu\text{mol/g}$ y 0,28 $\mu\text{mol/g}$ para EN y EV. En el lote II al segundo día, los niveles son similares a los registrados al inicio (0 d) y a partir del tercero, mostró una tendencia a disminuir hasta el final de la experiencia donde fueron cuantificados valores entre 0,63-1,12 $\mu\text{mol/g}$. El lote III presentó un comportamiento similar al anterior, en donde el IMP comenzó a disminuir con diferencia significativa ($P < 0,05$) desde el tercer día hasta el final del almacenamiento con 0,25-0,26 $\mu\text{mol/g}$. Las concentraciones finales de IMP alcanzadas en los tres lotes son bajas, indicando su defosforilación progresiva, con la consiguiente formación de INO. El patrón de descomposición del IMP depende de la especie, en muestras de "hoki" en hielo, la degradación del IMP fue lenta y al final de 25 d, todavía mantenía un 39% de IMP en relación al total de nucleótidos [18]. Mientras que en trucha arcoiris almacenada en hielo, el ATP se descompuso rápidamente a IMP, alcanzando este último 6 $\mu\text{mol/g}$ (4 d), para luego degradarse hasta 0,10 $\mu\text{mol/g}$ a los 16 d [11].

La INO presentó valores iniciales de 0,08 $\mu\text{mol/g}$. (lote I), 0,79 $\mu\text{mol/g}$. (lote II) y 0,67 $\mu\text{mol/g}$. (lote III). En el lote I se registró un aumento marcado durante los primeros seis días, encontrándose diferencias significativas ($P < 0,05$) entre estos

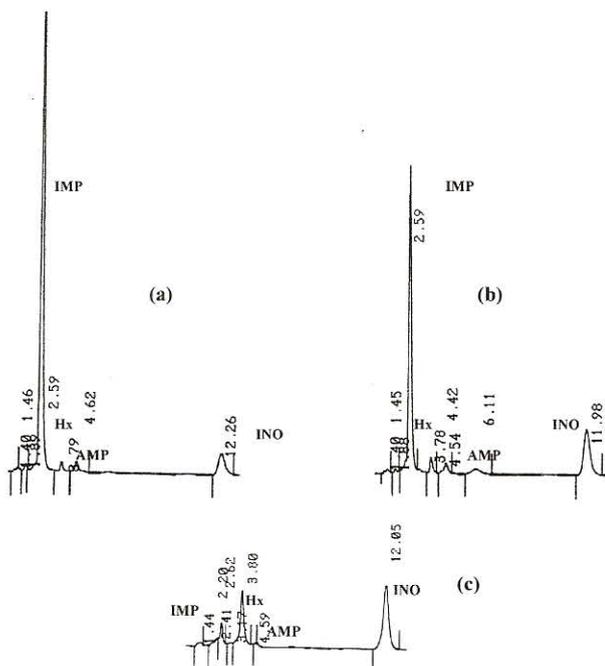


FIGURA 1. CROMATOGRAMAS DE LOS NUCLEÓTIDOS EXTRAÍDOS DE MUESTRAS DE SARDINAS A DIFERENTES DÍAS DE ALMACENAMIENTO: (a)=0, (b)=9, (c)=20. CONDICIONES CROMATográficas. VER SECCIÓN DE MATERIALES Y MÉTODOS.

días, para finalizar con cantidades entre 2,23-2,33 $\mu\text{mol/g}$. En el lote II el incremento fue progresivo hasta el sexto día (1,9 $\mu\text{mol/g}$), a partir del cual aumentó a 2,67-2,98 $\mu\text{mol/g}$ (20 d), siendo estos valores los más altos cuantificados en la experiencia. El lote III mostró un comportamiento similar hasta el décimo sexto día (2,32-2,65 $\mu\text{mol/g}$). La conversión de IMP a INO ocurrida durante el almacenamiento es la causa principal, de la pérdida de sabor en pescado. La inosina formada es degradada a hipoxantina, la cual contribuye con el sabor amargo alterando las características organolépticas [13].

Los valores iniciales de Hx fueron de 1,23; 0,24 y 0,08 $\mu\text{mol/g}$ para los lotes I, II y III respectivamente; en general se observó en todos una tendencia similar durante los 20 d. El nivel final de Hx para el lote I fue de 0,40-0,59 $\mu\text{mol/g}$, en II de 0,67-0,91 $\mu\text{mol/g}$ y en III de 0,36-0,87 $\mu\text{mol/g}$. La determinación de los niveles de Hx es utilizada para evaluar la duración del tiempo de almacenamiento en peces marinos, debido a que su acumulación en el tejido muscular de pescado, es el reflejo de la fase final de los cambios autolíticos, después del cual aumenta el desarrollo bacteriano [7].

En la FIG. 1, pueden observarse los cambios en la altura de los picos correspondientes a los nucleótidos evaluados. Al inicio del almacenamiento se observó un pico grande de IMP, disminuyendo progresivamente hasta el final del período de estudio, conduciendo así a la formación de Hx e INO.

El porcentaje de valor K es una relación de las concentraciones de Hx e INO con respecto al ATP y el resto de sus compuestos de degradación. De esta proporción, se deduce que cuanto menor sea el valor K, mayor será el grado de frescura del pescado [7]. Al aplicarse el análisis de varianza se determinaron diferencias significativas ($P < 0,05$), en los lotes evaluados a lo largo del almacenamiento, pero no para las condiciones EN y EV. Los valores iniciales de K fueron de 21,2; 15,7 y 10,8% para los lotes I, II y III respectivamente. Las variaciones entre los valores iniciales pueden atribuirse a diferencias de horas en el tiempo transcurrido desde que fueron capturados los lotes, así como también entre los individuos que los conforman.

El valor K para el lote I presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el día 0 (21,2%) y el primer día (13,1%), esta disminución pudo deberse a diferencias entre los individuos. Posteriormente fue observado un aumento entre 51 y 52% (9 d), valor límite para definir el pescado en estado fresco [15]. Al final del almacenamiento se manifestó una pérdida de frescura con valores K entre 85,9-88,3%. En el lote II el valor K indicó un estado de frescura aceptable, hasta el noveno día, luego del cual aumentó por encima del 50% y al vigésimo día alcanzó entre 80-83%. Para el lote III, el porcentaje del valor K, permaneció dentro del límite de frescura por un tiempo menor (6-9 d) que en los lotes anteriores y al finalizar la experiencia fueron determinados valores de 75-83%. En general se observa que un aumento de K coincide con la disminución de IMP, ya que ATP y ADP contribuyen aproximadamente con 0,5% en

TABLA IV
RELACIÓN Hx/INO EN SARDINAS ENTERAS (EN) Y ESVICERADAS (EV) SOMETIDAS A REFRIGERACIÓN EN HIELO DURANTE 20 DÍAS

| Días | Relación Hx/INO | | | | | |
|------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Lote I | | Lote II | | Lote III | |
| | EN | EV | EN | EV | EN | EV |
| 0 | 15,37 (*) | 15,37 (*) | 0,30 | 0,30 | 0,11 | 0,11 |
| 1 | 0,16 | 0,16 | 0,13 | 0,13 | 0,51 | 0,51 |
| 2 | 0,25 | 0,28 | 0,05 | 0,24 | 0,10 | 0,19 |
| 3 | 0,34 | 0,68 (*) | 0,08 | 0,21 | 0,19 | 0,14 |
| 6 | 0,40 | 0,18 | 0,10 | 0,19 | 0,12 | 0,10 |
| 9 | 0,43 | 0,44 | 0,15 | 0,15 | 0,22 | 0,19 |
| 13 | 0,16 | 0,11 | 0,20 | 0,13 | 0,30 | 0,28 |
| 16 | 0,32 | 0,18 | 0,18 | 0,25 | 0,23 | 0,27 |
| 20 | 0,26 | 0,17 | 0,34 | 0,22 | 1,31 (*) | 0,63 |
| X±DE | 0,29±0,10 | 0,22±0,11 | 0,16±0,08 | 0,20±0,06 | 0,22±0,14 | 0,22±0,13 |

(*) dato no considerado para el cálculo del promedio y desviación estándar. X±DE: Promedio ± Desviación estándar.

los resultados del valor K, para muestras con más de 48 h de capturadas [6].

Un valor K menor de 20% en productos pesqueros implica un alto grado de frescura, mientras que entre 20-40% es una frescura mediana y por encima de 40%, no es recomendable para su consumo [15]. Este índice de frescura depende de factores tales como: especie, arte de captura y tratamiento post-captura. En pargo (*Pagrus auratus*), dejado en reposo antes de sacrificarlo, se determinó un valor K de 4%, el cual aumentó hasta 20%, después de un período en hielo por 72 h [12]. En híbridos de tilapia recién capturados (*Oreochromis spp*) fueron registrados valores K menores a 19% y luego de transcurridos 28 d de almacenamiento los mismos alcanzaron valores superiores al 70% [5]. Mientras que en pescado blanco (*Coregonus wartmanni*) conservado en hielo durante 11 d fue observado un aumento progresivo de K hasta valores superiores al 80% [6].

En la TABLA IV pueden observarse las relaciones Hx/INO en los tres lotes y dos condiciones. Estos resultados tienen una alta desviación estándar, sin embargo la proporción de estos nucleótidos es cercana a 0,2-0,3, lo que implica que la fracción predominante es la INO sobre la Hx, estos datos señalan a las sardinas (*Sardinella aurita*) como especies de pescado productoras de INO.

CONCLUSIONES

Los principales nucleótidos detectados en las muestras correspondieron a IMP, Hx e INO. El IMP de la materia prima se degradó desde cantidades mayores de 4,7 μmol/g hasta 0,2-1,1 μmol/g al final del estudio. La Hx en los tres lotes siempre fue cuantificada en cantidades inferiores a 1,2 μmol/g,

mientras que la INO aumentó progresivamente hasta el día 6, alcanzando valores superiores a los 2 μmol/g y registrando las mayores concentraciones al final del almacenamiento.

Con respecto a IMP, Hx, INO y valor K, se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los lotes en relación a la época de captura, mientras que en las condiciones de EN y EV, para un mismo lote no se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$). El porcentaje inicial de valor K (10-21%) indica una materia prima con un grado alto de frescura, alcanzándose entre los días 9-13, valores superiores al 42%, los cuales señalan un deterioro de la frescura. El patrón de degradación indica que *Sardinella aurita* es una especie formadora de INO.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento de esta investigación a través de los proyectos: CDCH 03-33-2726-(92/94), CDCH 03.32.3587-95 y CDCH 03.32.3986-97 y, a JICA (International Japanese Cooperation Agency) por la donación de equipos para la realización de los ensayos, así como también a la empresa Compañía Anónima Industrial de Pesca (CAIP) al suministrar las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASHIE, I.N.A.; SMITH, J.P.; SIMPSON, B.K. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 36. (1&2): 87-121. 1996.

- [2] BERG, T.; ERIKSON, U.; NORDVEDT, T.S. Rigor mortis assessment of atlanti salmon (*Salmo Salar*) and effects of stress. **J. Food Sci.** 62(3): 439-446. 1997.
- [3] CABELLO, A.; BELLO, R. Pesquería y comercialización de la sardina en el oriente de Venezuela. **III Consulta de Expertos sobre la Tecnología de productos Pesqueros en América Latina**. Margarita. FAO. Fisheries Technical Paper. N° 538: 115-119. 1996.
- [4] EHIRA, S.; UCHIYAMA, H. Determination of fish freshness using the K-value and comments on some other biochemical changes in relations to freshness. En "**Seafood Quality Determination**". Ed. D.E. Kramer & J. Liston. Elsevier Science Publishers. Amsterdam: 209 pp. 1987.
- [5] EL KHORI, S. Evaluación física, química y sensorial del híbrido de tilapia (*Oreochromis spp*) durante su almacenamiento en refrigeración. Trabajo especial de grado. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela. 1998.
- [6] HATTURA, T.; KIESVAARA, M.; MORAN, M. Freshness evaluation in european whitefish (*Coregonus wartmanni*) during chill storage. **J. Food Sci.** 58(6): 1212-1215. 1993.
- [7] HUSS, H.H. Cambios *postmortem* en pescado. En: **El Pescado Fresco: su Calidad y Cambios de su Calidad**. FAO Fisheries Technical Paper. N 348, Rome, FAO: 42-45. 1998.
- [8] IWAMOTO, M.; YAMANAKA, H.; ABE, H.; USHIO, H.; WATABE, S.; HASHIMOTO, K. ATP and creatine phosphate breakdown in spkied plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. **J. Food Sci.** 53(6): 1662-1665. 1988
- [9] IWAMOTO, M.; YAMANAKA, H.; WATABE, S.; HASHIMOTO, K. Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceous*) muscle. **J. Food Sci.** 52(6): 1514-1517. 1987.
- [10] IZQUIERDO-PULIDO, M.L.; HATAE, K.; HARRD, N.F. Nucleotide catabolism and changes in texture indices during ice storage of cultured sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **J. Food Biochem.** 16: 173-192. 1992.
- [11] LAKSHMANAN, P.T.; BROWN, R.T.; AMES, G.R. Studies on nucleotide degradation in rainbow trout muscle to asses quality change. **Trop. Sci.** 33: 75-80. 1993.
- [12] LOWE, T.E.; RYDER, J.M.; CARRAGHER, J.F.; WELL, R.M.G. Flesh quality in snapper, (*Pagrus auratus*), affected by capture stress. **J. Food Sci.** 58(4): 770-796. 1993.
- [13] LUONG, J.; MALE, K.; MASSON, C.; NGUYEN, A. Hypoxantine ratio determination in fish extract using capillary electrophoresis and immobilized enzymes. **J. Food Sci.** 57(1): 77-81. 1992.
- [14] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA. Sección Pesqueras. Capítulo VII. **Anuario Estadístico Agropecuario**. Dirección de Estadística e Informática: 87-99. 1998.
- [15] OKUMA, H.; TAKAHASHI, H.; YAZAWA, S.; SEKIMUKAI, S. Development of a system with double enzyme reactors for the determination of fish freshness. **Analytica Chimica Acta.** 260: 93-98. 1992.
- [16] PRICE, R.J.; MELVIN, E.F.; BELL, J.W. Postmortem changes in chilled round, bled and dressed albacore. **J. Food Sci.** 56(2): 318-321. 1991.
- [17] RYDER, J.M. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 33(4): 678-680. 1985.
- [18] RYDER, J.M.; FLETCHER, G.C.; STEC, M.G.; SEELYE, R.J. Sensory, microbiological and chemical changes in hoki stored in ice. **Int. J. Food. Sci. Tech.** 28: 169-180. 1993.
- [19] SARPA. Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuícolas. **Informe Rubro Sardinias**. Ministerio de Agricultura y Cría. 5 pp. 1996.
- [20] SHAIDIHI, F.; CHONG, X.; DUNAJSKI, E. Freshness quality of harp seal (*Phoca groenlandica*) meat. **J. Agric. Food Chem.** 42: 868-872. 1994.
- [21] STATISTICAL GRAPHICS SYSTEMS. **User's guide. Statgraphics**. Versión 6.0. E.U.A. 1992.
- [22] VALVERDE, V.R. Estructura y composición química de los recursos marinos En: **Información Básica: Química, Bioquímica y Microbiología de Productos Pesqueros**. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, Callao, Perú. 1520 pp. 1994. *
- [23] VECIANA-NOGUES, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M.C. Determination of ATP related compounds in fresh and canned tuna fish by HPLC. **Food Chemistry.** 59(3): 467-472. 1997.
- [24] WANG, D.; TANG, J.; CORREIA, L.R.; GILL, T.A. Postmortem changes of cultivated atlantic salmon and their effects on salt uptake. **J. Food Sci.** 63(4): 634-637. 1998.
- [25] WATABE, S.; KAMAL, M.; HASHIMOTO, K. Postmortem changes in ATP, creatine phosphate, and lactate in sardine muscle. **J. Food Sci.** 56(1) :151-154. 1991.